

D6

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
20. Februar 2003 (20.02.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/013239 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A01N 1/00**

82256 Fürstenfeldbruck (DE). **JUCHEM, Gerd** [DE/DE];
Boschetsrieder Strasse 61a, 81379 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP02/08781**

(22) Internationales Anmeldedatum:
6. August 2002 (06.08.2002)

(74) Anwälte: **VOSSIUS, Volker** usw.; Geibelstrasse 6, 81679
München (DE).

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
101 38 564.1 6. August 2001 (06.08.2001) **DE**

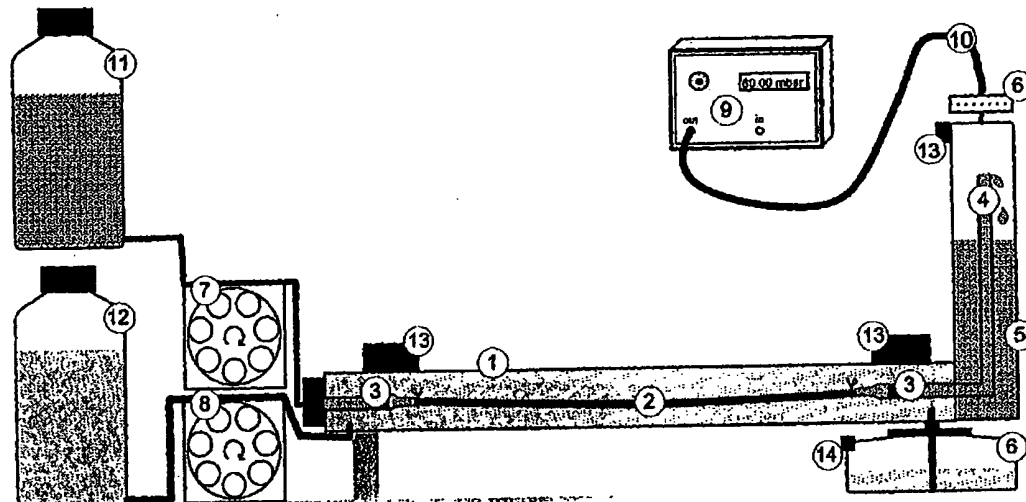
(71) Anmelder und
(72) Erfinder: **LAMM, Peter** [DE/DE]; Rebhuhnweg 20,

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE DEVITALISATION OF NATURAL ORGANS AND/OR FOR THE PREPARATION OF EX-
TRACELLULAR MATRICES FOR TISSUE ENGINEERING

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR DEVITALISIERUNG NATÜRLICHER ORGANE UND/ODER ZUR BEREITSTEL-
LUNG EXTRAZELLULÄRER MATRICES ZUM "TISSUE-ENGINEERING"



(57) Abstract: The invention relates to methods for devitalising and conserving human and animal organs and tissue, preferably natural hollow organs and the complete components thereof, in particular blood vessels and coronary valves. The invention further relates to methods for production of matrices for the partial and full construction of organs and tissues and furthermore to organs and tissue, in particular natural and artificial hollow organs, which may be obtained by said method. The invention also relates to the clinical application and use of organs thus produced in clinical and veterinary medicine, preferably in coronary and vascular surgery and novel culture media.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zur Devitalisierung und Konservierung menschlicher und Tierischer Organe und Gewebe, bevorzugt jedoch natürlicher Hohlorgane und deren sämtlicher Bestandteile, insbesondere von Blutgefäßen und Herzklappen. Des weiteren betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung von Matrices für den Teil- und Neuaufbau von Organen und Geweben. Darüber hinaus

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 03/013239 A2



(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EP, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

betrifft die Erfindung Organe und Gewebe, insbesondere natürliche und künstliche Hohlorgane, die nach den erfindungsgemässen Verfahren erhältlich sind. Weiterhin betrifft die Erfindung den klinischen Einsatz und die Verwendung der hergestellten Organe und Gewebe in der Medizin und Veterinärmedizin, vorzugsweise in der Herz- und Gefässchirurgie. Weiterhin betrifft die Erfindung neue Kulturmedien.

**Verfahren zur Devitalisierung natürlicher Organe und/oder zur
Bereitstellung extrazellulärer Matrices zum "Tissue-Engineering"**

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Devitalisierung und Konservierung menschlicher
5 und tierischer Organe und Gewebe, bevorzugt jedoch natürlicher Hohlorgane und deren
sämtlicher Bestandteile, insbesondere von Blutgefäßen und Herzklappen. Des weiteren
betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung von Matrices für den Teil- und
Neuaufbau von Organen und Geweben. Darüber hinaus betrifft die Erfindung Organe
und Gewebe, insbesondere natürliche und künstliche Hohlorgane, die nach den
10 erfindungsgemäßen Verfahren erhältlich sind. Weiterhin betrifft die Erfindung den
klinischen Einsatz und die Verwendung der hergestellten Organe und Gewebe in der
Medizin und Veterinärmedizin, vorzugsweise in der Herz- und Gefäßchirurgie. Durch
die erfindungsgemäßen Verfahren werden Organe und Gewebe bereitgestellt, die
15 gegenüber den mit herkömmlichen Verfahren hergestellten Organen und Geweben eine
höhere mechanische Stabilität und eine bessere Eignung zur weiteren Verarbeitung
durch die Methoden des "Tissue-Engineerings" aufweisen. Insbesondere wird die
immunologische Verträglichkeit und Antithrombogenität der bearbeiteten Organe und
Gewebe durch das erfindungsgemäße Auswaschungsverfahren von unerwünschten
20 Zellabbauprodukten und Zelldebris deutlich verbessert. Derartige Organe und Gewebe
zeigen eine im Vergleich zu den ursprünglichen Ausgangsorganen und -geweben und
ebenso eine im Vergleich zu Organen oder Geweben, die nur teilweise
erfindungsgemäß, das heißt ohne den Auswaschvorgang, hergestellt worden sind,
deutlich reduzierte Thrombogenität und Immunogenität.

25 Bislang werden zur Lagerung von Organen und Körpergeweben, die einer erneuten
Verwendung im Menschen wieder zugeführt werden sollen diverse
Konservierungstechniken verwendet:

Die kurzzeitige Lagerung menschlicher Herzklappen für 3 bis 4 Tage in einem
30 Antibiotika-Cocktail bei 4 °C wird dann vorgenommen, wenn bei Entnahme des
Spenderorgans bereits ein Empfänger für die betroffenen Herzklappen zur Verfügung

steht und aufgrund der Schwere dessen Erkrankung kein Aufschub der Operation mehr geduldet werden kann. Diese Technik wird als "Fresh Wet" -Transplantation bezeichnet. Eine längere Aufbewahrung der Organe führt zu deren Zerfall.

- 5 Des weiteren ist die Aufbewahrung von Organen nach Konservierung mit sogenannten "Cross-linking Agents", wie z.B. Glutaraldehyd, Formaldehyd, Polyetheroxide ("Polyepoxy Compound"), Hexamethylen oder Acylazide bekannt. Ein Vorteil dieser Technik ist die Möglichkeit zur langfristigen Lagerung nach Vorbehandlung mit dieser Technik. Ein Nachteil ist jedoch die prinzipielle Nichteignung derart vorbehandelten
- 10 Gewebes für den Einsatz in Körpersysteme, die einer hohen mechanischen Belastung unterliegen, wie z.B. die arterielle Strombahn. Derartig vorbehandelte Venen und Arterien zeichneten sich bislang durch erhöhte Frühverschlussraten und eine hohe mechanische Fehlerquote aus. Versuche "Cross-linking Agents" zu enttoxifizieren und anschließend durch Methoden des "Tissue-Engineering" wieder aufzubauen verliefen
- 15 bislang nicht erfolgreich.

Die klinisch bedeutsamste Konservierungstechnik von Organen und Geweben ist die Kryopräservation.

- 20 Die Kryopräservation und Lagerung von Organen und Körpergeweben zur Konservierung und späteren Verwendung, z.B. im Rahmen einer Transplantation, sind bekannt und klinisch etabliert. Die verwendeten Techniken unterscheiden sich dabei nur unwesentlich (Brockbank KGM. Basic Principles of Viable Tissue Preservation. In: Transplantation Techniques and Use of Cryopreserved Allograft Cardiac Valves and
- 25 Vascular Tissue. DR Clarke (ed.), Adams Publishing Group Ltd., Boston. S 9-23. American Association of Tissue Banks Standards for Tissue Banking (1995), A.A.T.B., McLean, VA, U.S.A. European Association of Tissue Banks General Standards for Tissue Banking (1995), E.A.T.B., Vienna, Austria).

Die Kryopräservierung findet vor allem bei der Lagerung von menschlichen Herzklappen, den sogenannten "Homografts", und bei der Lagerung menschlicher Venen oder anderer Gewebe Verwendung.

- 5 Der Einsatz von kryopräservierten Venenallografts beispielsweise ist ein etabliertes Verfahren in der Bypasschirurgie (Brockbank KGM et al., Cryopreserved vein transplantation. J. Cardiac Surg. 7:170-176, 1992; Gelbfish J. et al., Cryopreserved homologous saphenous vein: Early and late patency in coronary artery bypass surgical procedures. Ann. Thorac. Surg. 42:70, 1986; Fujitani RM et al., Cryopreserved saphenous vein allogenic homografts: An alternative conduit in lower extremity arterial reconstruction in infected fields. J. Vasc. Surg. 15: 519-526, 1992) und findet bei Patienten Verwendung, die nicht über genügend körpereigenes Gefäßmaterial verfügen, oder deren Gefäße qualitativ nicht geeignet sind. Häufig werden derart kryopräservierte Venen auch als Bypässe in infizierten Körperregionen eingesetzt. Hier verbietet sich der Einsatz prothetischen Materials durch die hohe, materialbedingte, Inzidenz des Protheseninfekts.

- Allerdings zeigen kryopräservierte Venen einen schlechten Langzeitverlauf (Bilfinger TV et al., Cryopreserved Veins in Myocardial Revascularization: Possible Mechanism for Their Increased Failure. Ann. Thorac. Surg. 63: 1063-69, 1997 und Kommentar in Ann. Thorac. Surg. 64: 1524-5, 1997. Marshin RS et al., Cryopreserved Saphenous Vein Allografts for Below Knee Lower Extremity Revascularization. Ann. Surg. 219: 664-72, 1994). Ursächlich hierfür dürfte vor allem eine immunologisch bedingte Degeneration der Venenwand sein (Carpenter JP, Tomaszewski JE, Immunosuppression for Human Saphenous Vein Allograft Bypass Surgery: a Prospective Randomized Trial. J. Vasc. Surg. 26: 32-42, 1997. Carpenter JP, Tomaszewski JE, Human Saphenous Vein Allograft Bypass Grafts: Immune Response. J. Vasc. Surg. 27:492-9, 1998). Darüber hinaus werden häufig thrombotische Frühverschlüsse kryopräservierter Venen beobachtet. Beide Prozesse wurden bislang in vielen Publikationen auf die Beschädigung des Spenderendothels im Rahmen der Kryopräservierung, die bis zum vollständigen Fehlen desselben führen kann, oder auf eine eingeschränkte Funktionalität

- des erhaltenen Endothels zurückgeführt (Brockbank KGM et al., Cryopreserved vein transplantation. J. Cardiac Surg. 7:170-176, 1992; Brockbank KGM et al., Functional analysis of cryopreserved veins. J. Vasc. Surg. 11: 94-102, 1990. Laub GW et al., Cryopreserved allograft veins as alternative coronary conduits: early phase results. Ann. Thorac. Surg. 54: 826-31, 1992. Louagie YA et al., Viability of long term cryopreserved human saphenous veins. J. Cardiovasc. Surg. 31: 92-100, 1990).

Demzufolge zielen bislang bekannte und bereits patentierte Kryopräservierungstechniken für Allo- und Xenografts darauf ab, einen möglichst hohen Erhaltungsgrad des vaskulären und mikrovaskulären Spenderendothels nach dem Reinigungsprozess zu gewährleisten. Der Erhaltungsgrad des Spenderendothels des kryopräservierten Gewebes wird in der Literatur mit 50% - 80% angegeben (Bambang LS et al., Effects of cryopreservation on the proliferation and anticoagulant activity of human saphenous vein endothelial cells. J. Thorac Cardiovasc. Surg. 110: 998-1004).

15

In neuerer Zeit wird jedoch gerade dem vaskulären und mikrovaskulären Endothel im Rahmen der akuten und chronischen Organabstoßung eine Schlüsselposition beigemessen. Endothel-spezifische nicht HLA-Antigene, die zu einer Aktivierung von CD4 T-Zellen führen, ermöglichen es dem Spenderendothel – im Zusammenwirken mit weiteren akzessorischen Molekülen – fremde Antigene dem Immunsystem des Empfängers anzubieten. Die Freisetzung von nicht HLA-Antigenen durch beschädigte Endothelzellen führt zu einer chronischen Immunreaktion und möglicherweise zur Graftvaskulopathie und chronischen Abstoßung (Rose ML, Role of endothelial cells in allograft rejection. Vasc. Med. 2(2): 105-14, 1997; Reul RM, Fang JC, Denton MD et al, CD 40 and CD 40 ligand (CD 154) are coexpressed in microvessels in vivo in human cardiac allograft rejection. Transplantation 64(12): 1765-74, 1997; Salom RN, Maguire JA, Hancock WW, Endothelial activation and cytokine expression in human acute cardiac allograft rejection. Pathology 30(1): 24-29, 1998). Umgekehrt bewirkt die selektive Entfernung des Spenderendothels das Ausbleiben akuter Abstoßungsreaktionen im Tierexperiment (Ratte) (Ann. Surg. 206: 757-764, 1987), wo

es anschließend zu einer spontanen Reendothelialisierung kommen kann. Derartig vorbehandelte Bypässe zeigten im Tierexperiment verbesserte Standzeiten.

Ausgehend vom Gedanken, dass die immunologisch bedingte Transplantatabstoßung
5 von allen zellulären Bestandteilen des Transplantats ausgeht, wurden verschiedene
Methoden zur Entfernung dieser Zellen entwickelt (U.S. Pat. No. 5,613,982). Dabei
fanden diverse hydrolytische Enzyme (z.B. Proteasen, Lipasen, Nukleotidasen,
Glykosidasen etc.), aber auch physikalisch-chemische Maßnahmen (Gebrauch
hypotonischer Medien oder Detergentien, Dampf-Phasen-Frierprozesse, pH-Extreme
10 etc.) Anwendung (U.S. Pat. No. 5,192,312; U.S. Pat. No. 5,632,778; U.S. Pat. No.
5,613,982, U.S. Pat. No. 5,843,182, WO 95/24873). Derartige Maßnahmen haben aber
den prinzipiellen Nachteil, dass nie ausgeschlossen werden kann, dass diese
Behandlungen auch die Festigkeit anderer, für die strukturelle Integrität von
Hohlorganwänden ebenfalls entscheidender Komponenten, wie z.B. der Kollagene,
15 insbesondere Typ I Kollagen, Proteoglykane oder Glykoproteine, schädigend
beeinflussen. Dies ist um so wichtiger, da schwerste Komplikationen, die auf einer
strukturellen Wandschwäche der kryopräservierten Venen beruhen, wie z.B. Einrisse der
Venenwand oder Wandaussackungen (Aneurysmen) der Venen, die zu
komplikationsträchtigen Reoperationen führen, die auch längere Zeit nach der
20 Implantation in den Menschen auftreten können bestens bekannt sind (Lehalle B et al.,
Early rupture and degeneration of cryopreserved arterial allografts. J. Vasc. Surg. 25:
751-2, 1997. Couvelard A. et al., Human allograft failure. Hum. Pathol. 26: 1313-20,
1995). Wenn dezellularisiertes Gewebe als Matrix für Rezellularisierungsmaßnahmen
dient, wird es notwendig, das zu transplantierende Gewebe mit hohen Konzentrationen
25 spezieller Adhäsionsfaktoren bzw. Wachstumsfaktoren zu inkubieren, um eine erneute
Ansiedlung von Zellen in der Wand zu ermöglichen (U.S. Pat. No. 5,632,778 und
5,613,982 bzw. U.S. Pat. No. 5,192,312, U.S. Pat. No. 5,843,182, WO 95/24873).
Derartige Präparate sind teuer, meist nicht für den klinischen Gebrauch zugelassen und
es ist noch weitgehend unbekannt, in welchem Ausmaß unphysiologisch hohe
30 Konzentrationen dieser Wirkstoffe die funktionelle Differenzierung von Geweben
beeinflussen. Dies ist um so wichtiger, da, wie oben bereits erwähnt, nur vollständig

differenziertes Endothel effektiv ist (Ku D et al., Human coronary vascular smooth muscle and endothelium-dependent responses after storage at -75°C . Cryobiology 29: 199-209, 1992).

- 5 Es ist heute bekannt, dass nach herkömmlicher Kryopräservierung immer noch ein gewisser Prozentsatz an viablen Spenderzellen verbleibt, was als Ansatzpunkt für immunologische Reaktionen diskutiert worden ist (Yankah AC et al., Antigenicity and fate of cellular components of heart valve allografts. In: Yankah AC, Hetzer R, Yacoub MH, eds. Cardiac valve allografts 1962-1987. Current concepts on the use of aortic and pulmonary allografts for heart valve substitutes. Darmstadt: Steinkopff Verlag 1988).
- 10 Andere Autoren hingegen halten die Viabilität des Transplantates für immunologisch unbedeutend und belegen sogar eine bessere Standzeit viabler Transplantate (O'Brian MF et al., A comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and valves, with note on chromosomal studies. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 94: 812-23, 1987. Angell WW et al., Long term function of viable frozen aortic homografts: a viable homograft valve bank. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 93: 815-22, 1987). Generell wird heute jedoch der viable Homograft bei der Kryopräservierung bevorzugt. Beim Herzklappenersatz mit kryopräservierten Homografts wurde bei ABO kompatiblen Transplantaten eine milde Abstoßungsreaktion nachgewiesen, bei ABO inkompatiblen
- 15 20 eine moderate akute Abstoßung. Bei beiden Formen der Abstoßung war eine T-Zell Aktivierung für 4-10 Tage nachweisbar. Eine klinische Relevanz bestand nicht (Fischlein T et al., Immunologic reaction and viability of cryopreserved homografts. Ann. Thorac. Surg. 60: 122-6, 1995).
- 25 Außer diesen Nachteilen werden in der betreffenden Literatur bisher kaum die Erkenntnisse zur Verteilung antithrombogener bzw. prothrombogener Aktivitäten bzw. Wirkstrukturen in der Wand von Hohlorganen berücksichtigt. Während sich vaskuläres Endothel (als Deckgewebe der Innen- bzw. luminalen Seite von allen Blutgefäßen und Blutgefäßklappen) z.B. durch eine Vielzahl antiaggregatorischer, antikoagulatorischer und profibrinolytischer Aktivitäten auszeichnet (Z. Kardiologie 82: Suppl. 5, 13-21, 1993; FASEB J. 2: 116-123, 1988), sind zelluläre Komponenten der tieferen Gefäßwand vor
- 30

- allem durch die Expression von Gewebefaktor charakterisiert, der im Kontakt mit Plasmafaktoren eine sofortige Gerinnungsreaktion einleitet (Thrombosis Res. 81: 1-41, 1996; J. Clin. Invest. 100: 2276-2285, 1997; FASEB J. 8: 385-390, 1994; Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17: 1-9, 1997). Eine Abschirmung gerade der prothrombogenen Wandaktivitäten von Hohlorganen ist nicht nur bei Blutgefäßen und Blutgefäßklappen, sondern auch bei allen anderen kryopräservierten und nicht kryopräservierten natürlichen oder künstlichen Hohlorganen bzw. Gefäßen von größter physiologischer Bedeutung.
- 10 Es ist beispielsweise bekannt, dass die Thrombomodulinaktivität des verbliebenen Spenderendothels nach der Kryopräservierung reduziert ist. Dies führt zu Einschränkung der antikoagulatorischen Funktion des Spenderendothels (Bilfinger TV et al., Cryopreserved veins in myocardial revascularization: possible mechanism for their increased failure. Ann. Thorac. Surg. 63: 1063-9, 1997).
- 15 Zur Vermeidung der oben beschriebenen Nachteile wurde schon frühzeitig vorgeschlagen durch Methoden des "Tissue-Engineerings" neue oder veränderte Organe mit verbesserten antithrombogenen Eigenschaften zu entwickeln (Weinberg CB, Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science*. 1986;231:397-400.). Hierbei konnte auf Erfahrungen zurückgegriffen werden, die bei
- 20 der Ansiedelung einer stabilen Endothelzellschicht an der Innenseite von Kunststoffprothesen gewonnen worden waren (Zilla P, Fasol R, Deutsch M, Fischlein T, Minar E, Hammerle A, Krupicka O, Kadletz M. Endothelial cell seeding of polytetrafluoroethylene vascular grafts in humans: a preliminary report. *J Vasc Surg*. 1987;6:535-41.). Zilla et al. konnten überzeugend belegen, dass eine stabile
- 25 Endothelzellschicht in der Tat die antithrombogenen Eigenschaften solcher Prothesen verbessert. Eine Auskleidung von zu implantierenden Blutgefäßen mit vaskulärem Endothel ist heute ein erklärtes Ziel der Biotechnologie und des "Tissue-Engineerings".

- Beim Versuch natürliche Hohlorgane mit Zellen zu besiedeln hat sich herausgestellt,
- 30 dass die Vorbeschichtung der betroffenen Organe mit Serum, das dem Empfänger der derart veränderten Organe entnommen worden war, eine ideale Matrix zur Ansiedelung

von Zellen darstellt (Lamm P et al. New autologous coronary bypass graft: First clinical experience with an autologous endothelialized cryopreserved allograft. J Thorac Cardiovasc Surg 117: 1217-9, 1999). Diese Vorbeschichtung zeichnet sich gegenüber einer Vorbeschichtung mit Fibronectin mit und ohne ein Proteoglycan (z.B. Heparinsulfat) (U.S. Pat. No. 5,192,312; U.S. Pat. No. 5,632,778; U.S. Pat. No. 5,613,982, U.S. Pat. No. 5,843,182, WO 95/24873, Zilla P. et al., Endothelial cell seeding of polytetrafluoroethylene grafts in humans. J. Vasc. Surg. 6: 535-541, 1987) durch die Verkürzung des Beschichtungsverfahrens und den Verzicht auf eine Reihe - bei anderen Verfahren üblichen - klinisch bislang nicht zugelassener Substanzen (u.a. Fibronectin) aus.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine neue, allgemein anwendbare Methode zur Konservierung und Lagerung von Organen und Geweben, insbesondere jedoch von Hohlorganen bereitzustellen. Eine weitere Aufgabe bestand in der Bereitstellung von Organen und Geweben, die gegenüber den mit herkömmlichen Verfahren hergestellten Organen und Geweben eine höhere mechanische Stabilität und eine bessere Eignung zur weiteren Verarbeitung durch die Methoden des "Tissue-Engineerings" aufweisen. Insbesondere wird die immunologische Verträglichkeit und Antithrombogenität der bearbeiteten Organe und Gewebe durch das erfindungsgemäße Auswaschungsverfahren von unerwünschten Zellabbauprodukten und Zelldebris deutlich verbessert. Derartige Organe und Gewebe zeigen im Vergleich zu den ursprünglichen Ausgangsorganen und -geweben und ebenso im Vergleich zu Organen und Geweben, die nicht erfindungsgemäß ausgewaschen wurden eine deutlich reduzierte Thrombogenität und Immunogenität.

Die Lösung dieser Aufgabe ergibt sich aus den Patentansprüchen, der nachfolgenden Beschreibung und den Abbildungen.

Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Devitalisierung und Konservierung von Organen und/oder Geweben zur Verfügung, bei dem die Organe und Gewebe steril entnommen und bis zum Erreichen des "devitalen steady states" in einer Flüssigkeit gelagert werden, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: sterilem Wasser, einer kristalloiden Flüssigkeit, einer kolloidalen Flüssigkeit, einer lipidhaltigen Flüssigkeit und einer Kombination der genannten Flüssigkeiten. Anschließend werden Zelltrümmer, zelluläre Abbauprodukte sowie lösliche Stoffe unter Druck (abhängig vom zu perfundierenden Gewebe oder Organ) vorzugsweise jedoch mit physiologischen, d.h. den natürlichen organ- und gewebespezifischen Perfusionsdrücken, mit einer Flüssigkeit, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den vorstehend genannten Flüssigkeit, ausgewaschen.

Die Auswaschung erfolgt dabei bevorzugt pulsierend, d.h. unter variablen (von der Präservationszeit abhängigen) Druckanstieg und Druckabfallkurven. Es werden somit gewebe- und organspezifische Druckwellen eingesetzt. Die Ermittlung geeigneter organ- oder gewebespezifischer Druckwellen erfolgt durch Ermittlung derjenigen Druckanstieg und Druckabfallwerte (Druckwellen), die notwendig sind, um eine Devitalisierung in dem jeweiligen Organ oder Gewebe zu erreichen. Der Druckanstieg (die Druckanstiegsgeschwindigkeit), das Druckniveau und der Druckabfall werden für das jeweilige Organ oder Gewebe bestimmt und sind dann optimal, wenn die Auswaschung zur Auswaschung von Zelldebris bei gleichzeitigem Erhalt der extrazellulären Matrix führt. Der Erhalt der extrazellulären Matrix und die erfolgreiche Auswaschung von Zelldebris (Zelltrümmern, -resten) kann histologisch überprüft werden. Es werden Bedingungen gewählt, die auf keinen Fall die Ausbildung des sogenannten „collagen cross linking“ verhindern. Auch dies kann durch histologische Untersuchungen überprüft werden.

Weiterhin stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Matrices für den Teil- und Neuaufbau von Organen und/oder Geweben zur Verfügung. Dieses Verfahren umfasst die Schritte der Devitalisierung und Konservierung von Organen und/oder Geweben nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren und die Zellrepopulation der Organe und Gewebe, z.B. die Reendothelialisierung. Zusätzlich

wird ein Kultivationsgerät zur Verwendung in einem der erfindungsgemäßen Verfahren bereit gestellt.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist zur Herstellung veränderter körpereigener Organe und Gewebe zur sofortigen klinischen Verwendung dieser Organe und Gewebe, wie z.B. im Falle von Arterien und Venen, deren sofortige Implantation nach durchlaufen des Herstellprozesses ohne eine zusätzliche Weiterbehandlung (z.B. Kryopräserva-
5 tion) der Gefäße, geeignet. Die erfindungsgemäß hergestellten Organe und Gewebe verfügen über deutlich höhere biomechanische Stabilitäten, als die selben Organe und Gewebe nach herkömmlichen Lagerungs- und Konservierungsmethoden (z.B. Kryopräserva-
10 tion). Zusätzlich stellt die Erfindung Verfahren zur Verfügung, die geeignet sind, um die erfindungsgemäßen Organe und Gewebe durch die Methoden des "Tissue Engineerings" in klinisch absolut unbedenklicher Weise weiterbehandeln zu können. Insbesondere stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Auskleidung von Hohlorganen mit
15 vaskulärem Endothel zur Verfügung, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Devitalisierung und Konservierung erhalten werden.

Darüber hinaus ist es möglich durch das erfindungsgemäße Verfahren organische und/oder künstliche Oberflächen, die mit Komponenten der extrazellulären Matrix (z.B. Kollagene, Glykosaminoglykane etc.) vorbeschichtet wurden, wie z.B. die
20 Innenoberfläche von Kunstherzen oder PTFE- und Dacronprothesen, so vor zu behandeln, dass sie eine – im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Oberflächen – deutlich reduzierte Thrombogenität und Immunogenität aufweisen.

Definitionen

25 Der Begriff "*Organe*" bedeutet, aus Zellen und Geweben zusammengesetzte Teile des Körpers, die eine Einheit mit bestimmten Geweben bilden.

Der hier verwendete Begriff "*Gewebe*" bedeutet, einzelne Arten von Zellverbänden, die gemeinsame Funktionen besitzen und die den Körper aufbauen.

"Erfindungsgemäße Organe" sind Organe der vorstehenden Definition, die den erfindungsgemäßen Herstellprozess durchlaufen haben und nur durch zusätzliche Weiterbehandlung in Form der Zellrepopulation der Organe, vorzugsweise durch
5 Reendothelialisierung ihre Funktionen ganz oder teilweise ausüben können. Die Zellrepopulation erfolgt vorzugsweise durch Methoden des "Tissue-Engineerings".

"Erfindungsgemäße Gewebe" sind Gewebe der vorstehenden Definition, die den erfindungsgemäßen Herstellprozess durchlaufen haben und sowohl mit, als auch ohne
10 Weiterbehandlung in Form der Zellrepopulation der Organe, vorzugsweise der Reendothelialisierung, insbesondere durch die Methoden des "Tissue Engineerings" klinisch verwendbar sind.

Als Gewebe, wie vorstehend definiert, werden auch Hohlorgane verstanden. Hohlorgane sind beispielsweise Blutgefäße, Blutgefäßklappen, Lymphgefäße, Lymphgefäßklappen,
15 Herzklappen, Harnleiter, Samenleiter und Bronchien.

"Erfindungsgemäße organische- oder künstliche Oberflächen" sind Oberflächen, die mit extrazellulärer Matrix oder Matrixkomponenten vorbeschichtet wurden und mit dem erfindungsgemäßen Verfahren weiterbehandelt wurden.

20

Der Begriff "*kristalloide Flüssigkeit*" bedeutet jede Form von gepufferten oder ungepufferten Salzlösungen. Bevorzugte Salzlösungen im Rahmen der Erfindung sind phosphatgepufferte Salinelösungen oder klinisch zugelassene Elektrolytlösungen (Ringerlösung).

25

Der hier verwendete Begriff der "*kolloidalen Flüssigkeit*" bedeutet protein- und/oder zuckerhaltige Lösungen. Bevorzugte kolloidale Flüssigkeiten sind Medium 199 und Brettschneidersche kardioplegische Lösung.

Der Begriff "*lipidhaltige Flüssigkeit*" bedeutet jede Form von fetthaltigen Lösungen.

Der hier verwendete Begriff "*dunkel*" bedeutet ohne Einfluss einer natürlichen oder künstlichen Lichtquelle.

5

Der Begriff "*unter Druck*" bedeutet Perfusion von Geweben und Organen mit erfindungsgemäßen Flüssigkeiten unter Applikation von Druck, abhängig vom zu perfundierenden Gewebe oder Organ, vorzugsweise jedoch unter Applikation organ- und gewebespezifischer Druckwerte (d.h. den allgemein bekannten und für die betroffenen Gewebe und Organe typischen Blutdruckwerten (= den physiologischen Druck)). Im Falle von erfindungsgemäßen Hohlgefäßen wird ein transmuraler Druckgradient über die Wand von ca. 20 – 100 mmHg bevorzugt. Im Falle komplexer Organe, wie z.B. der Leber erfolgt die Applikation eines Druckgradienten via dem natürlichen Blutzufluss und der Organumgebung. "*Steril*" bedeutet keinen Keimen
15 ausgesetzt.

Der Begriff "*variabler Flow*" bedeutet dass über den im Patent beschriebenen Bioreaktoren verschiedene Flussraten in den Hohlorganen erzeugt werden können. Dadurch kann beispielsweise in der Frühphase der erfindungsgemäßen Beschichtung von Hohlorganen mit Endothelzellen durch Anhebung des Flusses die Expression von Adhäsionsfaktoren aus den Endothelzellen gesteigert werden. Dies erleichtert wiederum die feste Verankerung der aufgebrauchten Endothelzellen.
20

Der Begriff "*Lyophilisation*" beschreibt ein bekanntes Verfahren, das zur Konservierung labiler, alterierender biologischer Substanzen dient. Die zu trocknenden Substanzen werden in einer Kältemischung (z.B. Kohlensäureschnee in Methylalkohol) schnell und schonend eingefroren und anschließend unter Hochvakuum (obere Grenze des Vakuums: 0.05 – 0,1 Torr) gebracht. Das Eis sublimiert und der entweichende Wasserdampf wird durch die Pumpe, unterstützt durch geeignete hygroskopische Mittel
25

(z.B. Tiefkühlkondensator) so schnell entfernt dass in Folge der Verdunstungskälte die zu trocknende Substanz im gefrorenen Zustande bleibt.

Der Begriff „*Kritisch-Punkt Trocknung*“ beschreibt ein bekanntes Verfahren zum
5 Trocknen biologischer Proben bei dem Wassers gegen ein Zwischenmedium (z.B. Ethanol) ausgetauscht wird und dieses Zwischenmedium dann erneut gegen CO₂ ausgetauscht wird. Hierbei macht man sich den Effekt zunutze, dass bei bestimmten Bedingungen (nämlich oberhalb des sogenannten kritischen Punkts) nicht mehr zwischen flüssiger und gasförmiger Phase unterschieden werden kann und es so möglich
10 ist, den direkten Phasenübergang flüssig => gasförmig zu umgehen.

Der hier verwendete Begriff "*Antibiotika*" bedeutet pilzliche oder bakterielle Stoffwechselprodukte und deren Abwandlungsprodukte mit hemmender oder abtötender Wirkung gegen Viren, Bakterien und Pilze. Zu den erfindungsgemäß bevorzugten
15 Antibiotika gehört unter anderem Gentamicin.

Der Begriff "*Devitalisation*" (= Devitalisierung) bedeutet Abtötung aller Zellen und die Reduktion der entsprechenden Organe und Gewebe auf das Niveau der extrazellulären Matrix des Bindegewebes. Dieser Zustand wird nachfolgend auch als "Erreichen der
20 Devitalisierung" bezeichnet. Das Erreichen der Devitalisierung kann histologisch überprüft werden.

Der hier verwendete Begriff "*devitaler steady state*" bedeutet den Zustand der Organe oder Gewebe nach Devitalisierung. Devitalisierung ist weiterhin dadurch
25 gekennzeichnet, dass wesentliche Änderungen der extrazellulären Matrix, der Organe oder Gewebe, wie beispielsweise intermolekulares "Crosslinking" der Kollagene, bereits weitgehend abgelaufen sind und diese Änderungen irreversibel sind.

Der Begriff "*Tissue-Engineering*" bedeutet Techniken, die es ermöglichen, verschiedene, teilweise organspezifische Zellen zu isolieren, zu kultivieren und zu vermehren (z.B. Reendothelialisation von Hohlorganen wie Arterien oder Venen). Letztendlich entstehen durch diese Techniken neue Organe und Gewebe.

5

Der hier verwendete Begriff "*Matrix*" bedeutet Grundgerüst für den Neuaufbau oder die Veränderung von Organen und Geweben durch Methoden des "*Tissue-Engineerings*". Zellen in der Gewebekultur werden auf diesen "*Matrices*" propagiert.

- 10 Der Begriff "*Repopularisation*" bedeutet die Rebesiedelung mit organ- oder gewebespezifischen Zellen, sog. "*Repopulationszellen*".

- Unter "*Apoptose*" (griechisch: das Fallen der Blätter im Wind) wird ein Vorgang verstanden, der auch programmierter Zelltod genannt wird und dazu benutzt wird, Gewebe und Organe zu devitalisieren. Apoptose ist die häufigste Form von Zelltod im Organismus. Apoptose spielt eine fundamentale Rolle zur Aufrechterhaltung der Homöostase von Geweben und Organen. Das Absterben einzelner Zellen ist eine essentielle Voraussetzung für das Überleben des gesamten Organismus, denn die Entstehung, Gestaltung und Erhaltung von Geweben wird nicht nur durch Zellvermehrung und Differenzierung gesteuert, sondern erfordert auch ein geordnetes Entfernen von überflüssig gewordenen oder geschädigten Zellen. Die Apoptose ist durch eine Vielzahl von morphologischen und biochemischen Veränderungen definiert. Diese Veränderungen umfassen das Schrumpfen der Zelle und die Kondensation des Chromatins, das sich an die Innenseite der Kernhülle anlagert und spezifisch in hochmolekulare Fragmente von 50 und 300 kbp (Kilobasenpaare) und in vielen Fällen in kleinere Fragmente von etwa 200 bp (Basenpaare) und einem Vielfachen davon gespalten. Zum gezielten Abbau von essentiellen Proteinen z.B. des Zytoskeletts werden spezifische Eiweiß-spaltende Enzyme wie Proteasen (Caspasen) aktiviert. Die Komposition der Plasmamembran verändert sich und die Zelle, insbesondere der Zellkern schrumpft, während die Zellorganellen relativ lange funktionsfähig bleiben.
- 15
20
25
30

Schließlich zerfällt die Zelle in membranumschlossene Abschnürungen ("apoptotic bodies"), die von Phagocyten oder Nachbarzellen abgebaut werden. Wichtig ist, dass bei der Apoptose die Plasmamembran intakt bleibt, damit keine Entzündungsreaktion ausgelöst wird.

5

Der Begriff "*synthetisches Material*", wie hier verwendet, bedeutet jedes organische und/oder anorganische Produkt, das für solche Zwecke geeignet ist. Insbesondere soll das synthetische Material die mechanische Stabilität der erfindungsgemäßen Organe und Gewebe erhöhen.

10

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Devitalisierung und Konservierung von Organen oder Geweben bis zum Erreichen der Devitalisierung, umfassend die sterile Entnahme und Lagerung des Organs oder Gewebes in einer Flüssigkeit, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: sterilem Wasser, kristalloider Flüssigkeit, kolloidaler
15 Flüssigkeit, lipidhaltiger Flüssigkeit oder einer Kombination der genannten Flüssigkeiten und die anschließende - bevorzugt pulsierende - Auswaschung von Zelltrümmern, zellulären Abbauprodukten sowie löslichen Stoffen unter Druck, vorzugsweise unter physiologischem Druck, mit einer Flüssigkeit, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: sterilem Wasser, kristalloider Flüssigkeit, kolloidaler Flüssigkeit,
20 lipidhaltiger Flüssigkeit oder einer Kombination der genannten Flüssigkeiten, wobei bevorzugte kristalloide Flüssigkeiten Bretschneiderscher Kardioplegischer Lösung oder Medium 199 (Seromed) sind. Weiterhin bevorzugt ist eine kristalloide Flüssigkeit, die einen Antibiotikazusatz enthält. Die Lagerung des Organs erfolgt in einer bevorzugten Ausführungsform im Dunkeln für mindestens 2 Wochen. Das Verfahren kann ebenso
25 unter Lichteinwirkung durchgeführt werden, bevorzugt jedoch unter UV Bestrahlung. Hierbei kommt es zur Photooxidation von Organen und Geweben. Bessere Ergebnisse werden jedoch bei Lagerung im Dunkeln erzielt.

Die Entnahme des Organs oder Gewebes von Toten (Multiorganspendern) ist besonders
30 bevorzugt.

In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt zusätzlich vor der Lagerung ein mehrfaches Spülen in der gleichen Flüssigkeit, in der auch die Lagerung erfolgt. Die Lagerung und Auswaschung von Zelltrümmern, zellulären Abbauprodukten und löslichen Stoffen kann in der gleichen Flüssigkeit erfolgen. Es ist hierbei
5 erforderlich, dass im Falle von Geweben ein Druckgradient über das Gewebe (z.B. bei Hohlorganen ein transmuraler Druckgradient, d.h. Druckgradient über die Wand des Hohlorgans) erzeugt wird. Im Falle von Organen wird ein Druckgradient zwischen den natürlichen, organeigenen Blut, und/oder Lymphgefäßen und dem Restorgan erzeugt.

10

In einer weiteren Ausführungsform erfolgt die Auswaschung von Zelltrümmern, zellulären Abbauprodukten sowie löslichen Stoffen mit organ- und gewebespezifischen Druckwellen mehrfach (abhängig von den zu behandelnden Organen und Geweben). Vorzugsweise erfolgt die Lagerung und Auswaschung der Organe und Gewebe in einer
15 sterilen Flüssigkeit. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt das Auswaschverfahren für Hohlorgane in dem erfindungsgemäßen Kultivationsgerät (Abb. 1).

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die
20 Lagerung der Organe und Gewebe für mindestens 6 Wochen, um einen "devitalen steady state" zu ermöglichen. Die Lagerung erfolgt besonders bevorzugt unter sterilen Bedingungen. Im Falle von Venen beträgt die besonders bevorzugte erfindungsgemäße Lagerungszeit 6 Monate, wobei anschließend vorzugsweise eine Auswaschung mit pulsierendem Druck erfolgt.

25

In einer weiteren Ausführungsform erfolgt die Lagerung der Organe und/oder Gewebe bei einem pH-Wert zwischen 3 und 9, bevorzugt zwischen 6.9 und 7.8, besonders bevorzugt zwischen 7.0 und 7.5 und bei einer Temperatur von 0 bis 55°C, bevorzugt 0 bis 37°C, besonders bevorzugt jedoch bei 4°C.

30

In einer weiteren Ausführungsform erfolgt die Lagerung der Organe und Gewebe unter reduziertem Sauerstoffdruck, besonders bevorzugt unter anaeroben Bedingungen.

5 In einer weiteren Ausführungsform erfolgt die erfindungsgemäße Devitalisierung und/oder Lagerung mit Gasen, die in der flüssigen Form (wie z.B. flüssiges CO₂), oder in der gasförmigen Form vorliegen können. Bevorzugt handelt es sich bei dem Gas um eine Edelgas.

10 Die erfindungsgemäßen Organe und/oder Gewebe können nach abgeschlossener erfindungsgemäßer Devitalisierung und Konservierung getrocknet werden. Diese Trocknung kann durch Lyophilisierung oder Kritisch-Punkt Trocknung nach Entwässerung erfolgen.

15 Organe und Gewebe, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Devitalisierung und Konservierung hergestellt wurden, weisen im Vergleich zu den nativen, frisch entnommenen Organen ein strukturell verändertes Grundgerüst (extrazelluläre Matrix) auf (intermolekulares "Crosslinking" und Seitenkettenmodifikationen, auch als "collagen cross linking" bezeichnet). Diese Organe und Gewebe bieten in idealer Weise - auch ohne eine spezielle Vorbeschichtung - die Voraussetzung für einen Teil- oder 20 Neuaufbau der betroffenen Organe durch Methoden des "Tissue-Engineerings". Darüber hinaus können die Organe und Gewebe, wie im Fall der vorbehandelten Blutgefäße, auch direkt, ohne jede weitere Maßnahme, klinisch implantiert werden.

25 Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Devitalisierung und Konservierung von Hohlorganen, beispielsweise von Blutgefäßen, Blutgefäßklappen, Lymphgefäßen, Lymphgefäßklappen, Herzklappen, Harnleitern, Samenleitern, Bronchien und Organen wie Harnblasen, Lebern, Nieren und Herzen.

- Durch das erfindungsgemäße Verfahren werden entscheidende Vorteile gegenüber bislang üblichen Verfahren erreicht. Die so hergestellten Organe und Gewebe verfügen über deutlich höhere biomechanische Stabilitäten, als die selben Organe und Gewebe nach herkömmlichen Lagerungs- und Konservierungsmethoden (z.B. Kryopräservation).
- 5 Bei erfindungsgemäß hergestellten Blutgefäßen zeigt sich ein, im Vergleich zu den selben Hohlorganen nach Kryopräservation, ein signifikant erhöhter Platzdruckwert (Abb. 5). Von außergewöhnlicher Bedeutung ist weiterhin, dass die so vorbehandelten Organe und Gewebe nicht oder nur wenig antigen oder thrombogen sind.
- 10 Bevorzugte erfindungsgemäße Hohlorgane sind, wenn sie als Arterien und Venen sofort wieder reimplantiert werden, vollkommen deendothelialisiert und weisen eine die Zellgrenzen überschreitende Anfärbung für Keratansulfat auf, bei ansonsten weitgehender Erhaltung der extrazellulären Matrix der betroffenen Hohlorgane. Dies betrifft insbesondere die dreidimensionale Erhaltung der konservierten
- 15 Kollagenstrukturen. Durch den langsamen Zerfall der viablen Strukturen während der Lager- und Konservierungszeit kommt es zu einem Absterben auch solcher Zellen, die normalerweise die Kryopräservation überleben (z.B. Perizyten, "Pericyte like cells"). Die von diesen Zellen gebildeten Antigene, die nach einer Kryopräservation noch nachweisbar sind (im Falle der Perizyten, "Pericyte like cells" beispielsweise der die
- 20 Gerinnung initiiierende Gewebefaktor ("Tissue Factor")), sind nach Vorbehandlung mit dem neuen Verfahren nicht mehr nachweisbar.

- In einem weiteren Aspekt der Erfindung wird im erfindungsgemäßen Verfahren die Devitalisierung von Organen und Geweben, beispielsweise mit Hilfe niedermolekularer
- 25 Substanzen, die die Apoptose direkt oder indirekt induzieren, verstärkt bzw. beschleunigt. In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Chemotherapeutikum (z.B. Methotrexat) zur Induzierung der Apoptose und damit zur Verstärkung und Beschleunigung der Devitalisierung eingesetzt. Die Verstärkung der Devitalisierung beispielsweise mittels niedermolekularer Substanzen kann während der
- 30 erfindungsgemäßen Lagerung des Organ oder Gewebes oder in einem vorgeschalteten Schritt erfolgen. Substanzen im Sinne der Erfindung bedeuten jede Substanz, die die

Apoptose direkt induziert oder aber die Interaktion von Signalmolekülen abschwächt oder verstärkt, die an der Apoptoseinduktion beteiligt sind. Insbesondere seien hier die bereits oben erwähnten Chemotherapeutika genannt.

- 5 Weiterhin betrifft die Erfindung Organe und Gewebe, insbesondere Hohlorgane, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt werden. Die Hohlorgane und insbesondere die Gefäße, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren devitalisiert und konserviert werden, bieten ideale Voraussetzungen für ihre Verwendung als Organmatrices (sogenannte Scaffolds) beim "Tissue-Engineering" und weisen im Falle
- 10 von Blutgefäßen, die auf der Innenoberfläche mit Patienten-autologen Endothelzellen ausgekleidet sind, bessere Langzeitoffenheitsraten auf als nicht beschichtete Hohlorgane bzw. Gefäße. Die Organe und Gewebe zur Herstellung der erfindungsgemäßen Matrices für den Teil- und Neuaufbau von Organen und/oder Geweben sind ubiquitär verfügbar. Die erfindungsgemäßen Matrices können ohne jeden Aufwand hergestellt werden, sie
- 15 sind - im Vergleich zu künstlichen Oberflächen - deutlich weniger thrombogen und weitaus weniger anfällig für Infektionen. Die Herstellung kann darüber hinaus von angelegten, nicht speziell ausgebildetem Personal in höchster Qualität vollzogen werden. Im Falle von Blutgefäßen zeigen die so erzeugten erfindungsgemäßen Blutgefäße die gleichen Operationseigenschaften (wie z.B. Näh- und Stechbarkeit) wie
- 20 unbehandelte körpereigene Blutgefäße. Es können ebenso erstmalig auch xenogene Blutgefäße ohne jede weitere Behandlung nach der erfindungsgemäßen Herstellung in den Menschen implantiert werden. Es besteht die Möglichkeit zur industriellen Umsetzung der erfindungsgemäßen Herstellung im größten Stil ohne jeden größeren Aufwand. Besonders bevorzugt ist hierbei jedoch die Herstellung einer hydratisierten
- 25 Matrix.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren werden im Falle komplexer Organe, wie z.B. Leber und Niere, aber auch im Falle von Hohlorganen, ideale Matrices für den Neuaufbau oder die Veränderung dieser Organe und Gewebe durch Methoden des

30 "Tissue-Engineerings" bereitgestellt.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung neue Kulturmedien, die dadurch gekennzeichnet sind, dass übliche Kulturmedien wie Basalmedien oder Vollmedien mit autologen (also körper-/patienteneigenen) Wachstumsfaktoren und/oder mit autologen (also körper-/patienteneigenen) Adhäsionsmolekülen supplementiert werden. Geeignete Basalmedien sind MEM Eagle, DMEM, Medium I99, MCDB 131, Ham's Medium, Iscore, RPMI (erhältlich z.B. bei Life Technology, Germany oder Geromed, Germany).

Die Kultivierung und Vermehrung verschiedener, teilweise organspezifischer Zellen wird durch das erfindungsgemäße Verfahren und insbesondere durch die erfindungsgemäßen Kulturmedien ermöglicht. Durch die erfindungsgemäßen Kulturmedien wird die organspezifische Differenzierung der eingesetzten Zellen erhalten bzw. erst hergestellt. Beispielsweise sind die bei der Propagierung von Leberzellen (Hepatozyten) unter Verwendung der erfindungsgemäßen Kulturmedien und Verfahren die bei herkömmlichen Techniken bekannten Probleme der Vermehrung und Differenzierung dieser Zellen bedeutungslos. Das heißt, es gelingt problemlos, die Zellen der Leber (Hepatozyten) zu kultivieren, wenn erfindungsgemäße mit autologen Wachstumsfaktoren supplementierte Kulturmedien Verwendung finden. Das gleiche trifft für die Zellen der Niere zu. Die so gewonnen Zellen dienen zur Modifikation oder auch dem Neuaufbau von Organen und Geweben, wobei die Organe und Gewebe auch ihrerseits vorbehandelt (z.B. kryopräserviert) sein können. Generell dienen diese Organe und Gewebe als Grundgerüste (Scaffolds) für deren Modifikation durch die Behandlung mit den oben erwähnten, durch die Methoden des "Tissue Engineerings", gewonnen Zellen. In idealer Weise werden dadurch dreidimensionale Konstrukte erzeugt, die die jeweiligen Funktionen des nachzuahmenden Organs oder Gewebes ganz oder teilweise übernehmen können.

Beispiele für erfindungsgemäße Hohlorgane, die sofort nach dem Verfahren zur Devitalisierung und Konservierung ohne jede weitere Vorbehandlung in den Menschen reimplantiert werden können, sind menschliche Blutgefäße, also Arterien und Venen. Beispiele für erfindungsgemäße Organe, die nach dem Verfahren zur Devitalisierung

und Konservierung als Matrices für den Neuaufbau von Organen verwendet werden können, sind u.a. menschliche Blutleiter, Lebern, Nieren, Harnleiter und Harnblasen.

Als besonders bevorzugte erfindungsgemäße Gefäße kommen allo- oder xenogene
5 Gefäße (Arterien, Venen, Lymphgefäße) mit und ohne Auskleidung mit autologen Endothelzellen auf der Innenoberfläche in Betracht.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Matrices für den Teil- und Neuaufbau von Organen, umfassend die Schritte der Devitalisierung und
10 Konservierung von Organen und/oder Geweben nach dem erfindungsgemäßen Verfahren und nach Erreichen des erfindungsgemäßen "devitalen steady states" die Repopularisation dieser Organe und/oder Gewebe, beispielsweise durch Reendothelialisierung. Besonders bevorzugt ist die Verwendung von autologen Zellen, z.B. autologen Endothelzellen für die Repopulation. Insbesondere bevorzugt ist dabei
15 der Einsatz der neuen Kulturmedien, enthaltend autologe Wachstumsfaktoren und/oder Adhäsionsmoleküle.

Im Falle von Hohlorganen, zu denen u.a. allogene Gefäße, xenogene Gefäße und Harnleiter zählen, erfolgt nach der Devitalisierung und Konservierung dieser Organe
20 und Gewebe die Reendothelialisierung. So ist es beispielsweise möglich, Matrices xenogenen Ursprungs für den Aufbau eines neuen Gefäßes und dessen Endothelialisierung (z.B. bovine Brustwandarterien, die dem erfindungsgemäßen Verfahren unterzogen wurden) zu verwenden.

25 Die Erfindung betrifft daher auch solche Organe und Gewebe, die durch das erfindungsgemäße Verfahren, umfassend die Devitalisierung und Konservierung sowie die Reendothelialisierung hergestellt wurden.

Die erfindungsgemäßen Hohlorgane, die vor ihrer Implantation reendothelialisiert wurden, weisen an der Innenoberfläche bzw. der luminalen Oberfläche vorzugsweise eine Auskleidung mit Patienten-autologen Endothelzellen auf. Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst Gefäße und ihre Klappen, die mit Empfänger-autologen Endothelzellen auf der Innenoberfläche bzw. der luminalen Oberfläche ausgekleidet sind.

Perfusionsversuche von endothelialisierten erfindungsgemäßen Spendergefäßen zeigten keine Unterschiede in der Endothelmorphologie und Scherkraftstabilität zu vollkommen intakten, frisch gewonnenen Venen oder Arterien.

Das Endothel aller Blutgefäße, vaskulären Klappen und Herzhöhlen ist nicht nur durch die oben genannten antithrombogenen Merkmale gekennzeichnet. Es stellt im gesunden, intakten Zustand eine immunologisch wichtige Barriere gegenüber der Masse der im Blut befindlichen Abwehrzellen (Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten) dar, die ohne direkte Kontaktmöglichkeit mit der Endothelschicht vorbeigleiten.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht auf der luminalen Oberfläche eines Blutgefäßes bzw. seiner Klappen eine absolut konfluente, gegen die Scherkräfte des vorbeiströmenden Blutes dauerhaft verankerte Endothelschicht zu etablieren. Diese wirkt als komplexer antithrombogener und antiinflammatorischer Katalysator, um die Thromboembolisierung der Hohlorgane zu verhindern. Organe, die mit Patienten-autologen Zellen ausgekleidet, verändert oder gänzlich neu aufgebaut wurden, lösen nicht nur keine Immunantwort an deren luminaler Oberfläche aus, sondern schränken eine mögliche immunologische Abwehr auch im Bereich tieferer Wandschichten erfahrungsgemäß so ein, dass es nicht zu einer klinisch relevanten Abstoßung der Gefäße kommt. Im Gegensatz beispielsweise zu kryopräservierten und autolog endothelialisierten Blutgefäßen verhindert das neue Verfahren erstmalig die bei diesen Gefäßen noch vorhandene leichte Restabstoßungsreaktion vollständig und ermöglicht erstmalig bei gleichzeitiger Verwendung des ebenfalls erfindungsgemäßen Einsatzes der

neuen Kulturmedien mit autologen Wachstumsfaktoren eine klinikrelevante Rebesiedelung komplexer Organe wie beispielsweise der Leber oder der Niere, die bislang an der Antigenität der Grundsubstanz dieser komplexen Organe gescheitert sind.

- 5 Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung den klinischen Einsatz komplexer Organe, die dem erfindungsgemäßen Verfahren entsprechend hergestellt wurden.

10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Zellrepopulation, insbesondere die Reendothelialisierung ohne jede Vorbeschichtung der Spendergefäße mit Adhäsionsfaktoren oder Serum allein durch die direkte Aussaat und Ansiedelung der Zellen, die unter Einsatz der neuen Kulturmedien mit autologen Wachstumsfaktoren hergestellt wurden, auf die Gefäßinnenoberfläche vorgenommen. Dies ist mit keinem bislang bekannten Beschichtungsverfahren möglich.

- 15 Die Erfindung betrifft daher ebenfalls Verfahren zur Erzeugung und Verwendung der neuen Kulturmedien. Autologe Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle werden erfindungsgemäß erstmalig als Zusatz zu Kulturmedien und zur Initialbehandlung der zu repopularisierenden Organe und Gewebe verwendet. Besonders vorteilhaft ist die Verwendung von mit autologen Wachstumsfaktoren und/oder Adhäsionsmolekülen
- 20 angereicherten erfindungsgemäßen Kulturmedien, um vor der Aussaat der Zellen eine Vorbeschichtung der Hohlorgane mit autologen Adhäsionsmolekülen oder mit Wachstums- und Adhäsionsfaktoren zu erreichen. Diese erfindungsgemäßen Kulturmedien eignen sich bevorzugt zur Züchtung von Zellen aus dem Gefäßsystem des Menschen, insbesondere vaskulärer Endothelzellen. In der Biotechnologie, insbesondere
- 25 für den Einsatz am Menschen, ist die Verwendung von nicht-autologen oder gentechnisch hergestellten Wachstumsfaktoren klinisch und forensisch oftmals problematisch. Dies drückt sich in eindrucksvoller Weise dadurch aus, dass nahezu jedes sich zur Zeit auf dem Markt befindliche Kulturmedium vom jeweiligen Hersteller trotz nachgewiesener Eignung für die Zellkultur, nicht für den Einsatz am Menschen
- 30 freigegeben ist. Hierfür ursächlich sind die in der Regel diesen Medien zugefügten

Bestandteile humanen oder tierischen Ursprungs, insbesondere bei den serumfreien Medien. Die sich daraus möglicherweise ergebenden Haftungsansprüche an die jeweiligen Hersteller verhindern einen klinischen Einsatz komplexer Wachstumsmedien am Menschen. Die erfindungsgemäßen Kulturmedien ermöglichen, dass die Züchtung

5 humaner Zellen problemlos ist.

Beispiele für Basalmedien, d.h. basale chemisch definierte Kulturmedien für verschiedene Zelltypen sind: Minimal Essential Medium (MEM) zur Züchtung von adhärennten Säugetierzellen (Dulbecco R, G. F. Plaque production by the Polyoma virus. *Virology*. 1959;8:396-397), Medium 199 für die Züchtung von Maus-Fibroblasten oder

10 RPMI Medium zur Züchtung von Tumorzellen. Diese Medien unterscheiden sich in der Zusammensetzung u.a. von Aminosäuren, Vitaminen, Spurenelementen, organischen Salzen und anderer organischer Stoffe die das Wachstum der kultivierten Zellen ermöglichen.

15

Der Begriff Basalmedien wird hier gleichbedeutend mit "basale chemisch definierte Medien" verwendet. Der Begriff "basale chemisch definierte Medien" wird in der Gewebekultur für Kulturmedien von bekannter qualitativer und quantitativer chemischer Zusammensetzung benutzt. Im Gegensatz dazu enthalten andere Medien, hier genannt

20 Vollmedien Naturprodukte wie z.B. Tierserum.

Für die optimale Züchtung von Säugetierzellen werden basale chemisch definierte Medien mit verschiedenen Seren supplementiert. Vorzugsweise mit fetalem Kälberserum (FCS) oder Neugeborenem Kälberserum (NCS) und/oder mit anderen

25 nicht genau definierten Wachstumsfaktoren (z.B. endothelial cell growth supplement: ECGS).

Ein weiterer Teilaspekt der Erfindung betrifft daher Verfahren, bei dem autologe, auf verschiedene Weise gewonnene Wachstumsfaktoren entweder alleine oder in

30 Kombination mit autologem Serum oder in Kombination mit anderen nicht-autologen

Wachstumsfaktoren den entsprechenden Kulturmedien zugesetzt werden. Hierbei spielt es keine Rolle, ob bevorzugt basale chemisch definierte Medien (z.B. MCDB 131) oder sogenannte Vollmedien (z.B. Gibco HE-SFM) verwendet werden. In jedem Fall wird 1. das Wachstum der Zellen, insbesondere der Endothelzellen, deutlich beschleunigt (Wachstumskurven, siehe Abb. 2), 2. die Differenziertheit der Zellen signifikant erhöht und 3. die Lebensdauer der Zellen vervielfacht. Als weiterer, besonders hervorzuhebender Vorteil ist die absolute klinische Unbedenklichkeit der so aus chemisch definierten Medien entstehenden neuen Kulturmedien zu betonen, die erstmals die Voraussetzung für eine wirtschaftliche Verwertung fast aller bisher nach den Methoden des "Tissue Engineering" produzierten Produkte schafft. Dies dürfte ein neuer Meilenstein für die Umsetzung *in vitro* hergestellter Gewebe- und Organe für die sichere Anwendung am Menschen sein.

Detaillierte Beschreibung der erfindungsgemäßen Kulturmedien

Die neuen Kulturmedien dienen zur Steigerung von Wachstum, Remodellierungsvorgängen und Reduktion von Entdifferenzierungsvorgängen von vaskulären Zellen in der Zellkultur und sind dadurch gekennzeichnet, dass einem basalen chemisch definierten Medium oder einem Vollmedium autologe (also körperl-/patienteneigenen) Wachstumsfaktoren und/oder autologe Adhäsionsmoleküle zugesetzt werden. Das erfindungsgemäße Kulturmedium umfasst neben dem Basalmedium (= basales chemisch definiertes Medium) oder Vollmedium 5-30%, vorzugsweise 5-20%, insbesondere bevorzugt 10-15% autologes Serum. Autologes Serum meint patienteneigenes (von dem Patienten gewonnenes) Serum, das die autologen Wachstumsfaktoren und/oder die autologen Adhäsionsmoleküle enthält und vorzugsweise nicht hitzeinaktiviert ist.

Zusätzlich können dem erfindungsgemäßen Kulturmedium rekombinante Wachstumsfaktoren zugesetzt werden. Beispiele für geeignete rekombinante Wachstumsfaktoren sind bFGF, VEGF, EGF, TGF, "Scatter-factor", PDGF oder eine Kombination dieser Wachstumsfaktoren.

Die autologen Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle können aus Blutplättchen und/oder weißen Blutkörperchen hergestellt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die autologen Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle aus angereicherten Blutplättchen gewonnen. Weiterhin können die autologen Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle aus geronnenem autologem Vollblut durch Zentrifugation hergestellt werden. Vorzugsweise wird das gewonnene autologe Vollblut für mindestens für 1 Stunde bei 37°C oder für 6 Stunden bei 4°C gelagert (siehe Abbildung 6).

10

In einer weiteren Ausführungsform kann dem erfindungsgemäßen Kulturmedium zusätzlich Glycosaminoglycan zugegeben werden. Besonders bevorzugte Glycosaminoglycane sind Heparin, Heparinsulfat, Chondroitin, Chondroitinsulfat, Dermatin oder Dermatinsulfat.

15

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform kann das erfindungsgemäße Kulturmedium zusätzlich mit Transferrin, Hydrocortison, Insulin, Selen oder Albumin supplementiert werden.

20 Das erfindungsgemäße Kulturmedium ist zur Anzucht von vaskulären Zellen, insbesondere Endothelzellen, Perizyten, "Pericyte-like-cells" und glatten Muskelzellen geeignet. Weiterhin ist das Kulturmedium auch zur Anzucht von nicht vaskulärer Zellen, insbesondere von Hepatozyten geeignet.

Darüber hinaus kann das Kulturmedium als Kultivationsmedium im Rahmen des "Tissue-Engineerings" verwendet werden. Insbesondere ist es als Medium zum "Precoating" (zur Vorbeschichtung) vaskulärer Prothesen, Herzklappen und Bypässen beim "Tissue-Engineering" geeignet. In einer bevorzugten Ausführungsform kann das erfindungsgemäße Kulturmedium als Präservationslösung bei der Gewebe-Lagerung (dem "Tissue-Banking") eingesetzt werden.

In einer weiteren Ausführungsform können die autologen Wachstumsfaktoren durch mechanische Zerstörung körpereigener Gewebe gewonnen werden. Bevorzugt können die autologen Wachstumsfaktoren durch chemische und/oder biochemische Zerstörung körpereigener Gewebe gewonnen werden. Besonders bevorzugt können die autologen Wachstumsfaktoren durch Apoptose körpereigener Gewebe gewonnen werden. Weiterhin kann die Gewebezzerstörung durch Ultraschall erfolgen.

Nachfolgend sind bevorzugte Verfahren zur Gewinnung von autologem Serum beschrieben:

Gewinnung von autologem Serum:

Entnahme von Vollblut ohne gerinnungshemmende Substanzen (wie z.B. Citrat) vom Empfänger des zu produzierenden Gewebes. Einleitung der physiologischen Gerinnung durch künstliche Oberflächen (z.B. Serumröhrchen) oder gerinnungsaktivierender Substanzen (z.B. Thrombin). Gewinnung des Serums durch Zentrifugation des entstehenden Blutkuchens bei 400 g für 10 Minuten. Anschließendes Abpipettieren des Überstandes (= Serum).

Gewinnung von autologem Serum angereichert mit aus Blutzellen freigesetzten autologen Wachstumsfaktoren:

Die Gewinnung von Vollblut ohne gerinnungshemmende Substanzen nach dem Fachmann bekannten Methoden. Durch Einleitung der Gerinnung (siehe oben) kommt es auch zur Aktivierung von Blutzellen, insbesondere von Blutplättchen und weißen Blutkörperchen. Eine Initiierung der Gerinnung und gleichzeitige Aktivierung der Blutzellen kann auch durch Zugabe von „Aktivatoren“ (z.B. 1 IE/ml Thrombin) erfolgen. Dabei kommt es zur progredienten Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF, PDGF, FGF). Es ist beispielsweise bekannt, dass die Freisetzung von VEGF aus den aktivierten Blutplättchen nach 1 h bei 37°C ein Maximum erreicht. Um möglichst viele der Wachstumsfaktoren zu gewinnen, wird das geronnene Blut deshalb für mindestens

eine 1 h bei 37 °C oder mindestens 6 Stunden bei 4 °C gelagert. Anschließend erfolgt zur Gewinnung des Serums mit den darin enthaltenen Wachstumsfaktoren die oben genannte Zentrifugation und das Abpipettieren des Überstandes, der einen Großteil der Wachstumsfaktoren enthält.

5

In einer weiteren Verfahrensvariante zur Herstellung von autologem Serum mit einem höherem Anteil von autologen Wachstumsfaktoren aus Blutzellen wird Citratblut gewonnen und die festen Bestandteile (Blutzellen) abzentrifugiert. Entsprechend dem gewünschten Anreicherungsfaktor wird ein Teil des Überstandes (Plasma) abpipettiert.

10 Nach Resuspension der Blutzellen und Rekalkifikation wird die Gerinnung durch künstliche Oberflächen oder durch physiologische Aktivatoren (z.B. Vollblut oder Thrombin) eingeleitet. Die Gewinnung des wachstumsfaktorenenreichen Serums erfolgt wie oben beschrieben.

15 Nachstehend ist die Gewinnung von autologen Wachstumsfaktoren aus Blutzellen beschrieben:

Gewinnung thrombozytärer autologer Wachstumsfaktoren:

Abnahme von Citratblut. Gewinnung von plättchenreichem Plasma durch vorsichtige Zentrifugation (315 g für 10 Minuten) und Abpipettieren des Überstandes. Freisetzung
20 der autologen Wachstumsfaktoren durch Degranulation der Plättchen nach Rekalkifikation und Aktivierung mit bevorzugt Vollblut (1 ml auf 10 ml Plättchenreiches Plasma). Angereicherte Wachstumsfaktoren können durch vorheriges Ankonzentrieren der Plättchen z.B. auf 2 Million/ml und anschließender Aktivierung wie vorstehend beschrieben gewonnen werden.

25

Die Gewinnung von weißen Blutkörperchen erfolgt beispielsweise durch Zentrifugation von Citratblut, Abpipettieren des "Buffy coat" und anschließender Aktivierung (z.B. mit FMLP).

In einer weiteren Verfahrensform können ankonzentrierte weiße Blutkörperchen und Blutplättchen gemeinsam aktiviert werden. Die Gewinnung des Wachstumsfaktoren reichen Serums erfolgt wie oben durch Zentrifugation.

5 Gewinnung von autologen Wachstumsfaktoren aus Blutzellen und anderen Geweben durch mechanischen Aufschluss der Zellen:

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Lyse der Zellen durch Komplementaktivierung oder Apoptose.

10

Gewinnung von konzentriertem autologem Serum oder konzentriertem wachstumsfaktorenreichen Serums:

Entzug von Wasser aus den Seren durch einen Konzentrator (z.B. Dextranomer, Polyacrylamid). Dextranomer und Polyacrylamid Konzentratoren sind kommerziell erhältlich (Sephadex von Pharmacia, Bio-Gel P von Bio-Rad Laboratories). Alternativ können andere Konzentratoren wie Silika-Gel, Zeolites, Dextramines, Alginate Gel, crosslinked Agarose verwendet werden.

20 Gegebenfalls kann das gewonnene Gemisch gegen physiologische Lösungen (Hanks Salze, Earle's Salze, Basalmedien) dialysiert werden.

Neben der Zugabe von autologem Serum und autologen Wachstumsfaktoren in basale chemisch definierte Medien erwies sich der zusätzliche Zusatz von Heparin, Insulin,

25 Hydrocortison, ggf. Transferrin und Selen als wachstumssteigernd. Insbesondere Heparin erwies sich als wichtiger Co-Faktor.

Nachfolgend sind Verwendungsmöglichkeiten des erfindungsgemäßen Kultivationsgeräts beschrieben:

Die Beschichtung erfindungsgemäßer Hohlorgane kann mit allen für derartige
5 Maßnahmen üblichen Apparaturen vorgenommen werden, besonders geeignet ist jedoch das erfindungsgemäße Kultivationsgerät (Bioreaktor) (Abb. 1). Es ergaben sich folgende Vorteile durch die Verwendung dieses Kultivationsgerätes:

Es wird ein konstanter, beliebiger Druckgradient über die Venenwand erzeugt.
10 Zusätzlich kommt es zum Transport von Medium über die Venenwand, das zur Ernährung der aufgetragenen Endothelzellen und ggf. anderer in die Venenwand eingebrachter Zellen dient. Außerdem werden möglicherweise noch vorhandene gefäßwandinhärente Antigene in das Außenmedium ausgewaschen. Zusätzlich kann mit dem erfindungsgemäßen Bioreaktor eine Dauerperfusion besonders von
15 endothelialisierten Hohlorganen vorgenommen werden, falls es erforderlich erscheint, bestimmte Differenzierungszustände von Zellen besonders zu unterstützen. Hierbei kommt es zu einer deutlich gesteigerten Synthese der extrazellulären Matrix, die die Scherkraftstabilität der aufgetragenen Endothelschicht der betroffenen Hohlorgane besonders fördert. Bei diesem Gerät handelt es sich um ein einfaches, leicht zu
20 handhabendes, kostengünstiges und sicheres Hilfsmittel zur Endothelialisierung von Hohlorganen jeder Art.

Weiterhin ist das erfindungsgemäße Kultivationsgerät auch für folgende Prozesse geeignet:

- 25 • Zur Rezellularisierung von prosthetischem und organischem Material, insbesondere zur Reendothelialisierung mit und ohne Perfusion des Hohlorgans.
- In Modifikation (Abb. 3), zur Ausschwemmung ungewünschter löslicher und nichtlöslicher Stoffe aus prosthetischem und organischem Material, insbesondere von Hohlorganen. Die Ausschwemmung erfolgt durch Applikation eines transmuralen
30 Druckgradienten (Druckgradient über die Wand des Hohlorgans), der der

Aufrechterhaltung eines für die Ausschwemmung dieser Stoffe zusätzlich erwünschten osmotischen und onkotischen Gradienten zwischen dem zu behandelten Gewebe und dem Außenmedium dient und durch einen zusätzlichen Austausch des Außenmediums.

- 5 Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Matrices für den Teil- und Neuaufbau von Organen und Geweben kann bei allen natürlichen und künstlichen Hohlorganen und deren Bestandteilen angewendet werden, beispielsweise bei natürlichen Blutgefäßen, Blutgefäßklappen, bei Lymphgefäßen, Lymphgefäßklappen, bei Harnleitern und Harnblase, Samenleitern, Bronchien, beim Herzen und insbesondere
10 bei Herzklappen.

- Bei der Herstellung sogenannter biologischer Herzklappen aus xenogenen Materialien (beispielsweise aus bovinem Perikard) werden die betroffenen Ausgangsmaterialien oft mit sogenannten Quervernetzern (z.B. Glutaraldehyd) fixiert. Hierdurch verlängert sich
15 die mögliche Dauer der Lagerung der betroffenen Ausgangsmaterialien. Anschließend werden die Ausgangsmaterialien auf sogenannte "Stents" zur Erreichung einer biologischen Form und biomechanischen Stabilität aufgezogen. Diese "Stents" dienen auch als Widerlager für das Verankern der chirurgischen Nähte bei der Implantation. Es ist bekannt, dass es nach Implantation derartiger Herzklappen zu chronisch ablaufenden
20 immunologischen Vorgängen kommt, die letztendlich in einer Degeneration der betroffenen Herzklappe führen. In der Regel beträgt die Haltbarkeit solcher Herzklappen nach ihrer Implantation in den Menschen maximal 15 Jahre, danach muss ein Austausch der Herzklappe in einem Zweiteingriff mit deutlich erhöhtem Operationsrisiko für den betroffenen Patienten durchgeführt werden. Ursächlich für diese immunologischen
25 Vorgänge sind antigene Strukturen des zur Herzklappenherstellung verwendeten Ausgangsgewebes. Bei Verwendung der erfindungsgemäßen Ausgangssubstanzen werden solche antigenen Strukturen vollständig beseitigt und die Standzeiten biologischer Herzklappen verbessert. Derartige erfindungsgemäße Herzklappen können nun ohne jede Weiterbehandlung implantiert werden. Sie können aber auch mit jeder bislang bei
30 der Herstellung von biologischen Herzklappen verwendeten Präservationssubstanz oder Technik weiterbehandelt werden.

Es konnte festgestellt werden, dass sich, im Falle von Hohlorganen, insbesondere von Venen, die mechanische Stabilität der beschichteten und unbeschichteten erfindungsgemäßen Hohlorgane nach 12-monatiger Lagerung nicht von der frisch entnommener Spendervenen (Platzdrucktest und histologische Untersuchungen der 5 extrazellulären Matrix) unterschied. Allerdings zeigten die erfindungsgemäßen Gefäße eine, im Vergleich zu kryopräservierten Gefäßen, deutlich erhöhte mechanische Stabilität (Abb. 5).

10 Vorzugsweise kann das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Matrices für den Teil- und Neuaufbau von Organen und Geweben bei Spendergefäßen (Venen oder Arterien), sowie bei Xenografts angewendet werden. Ein besonderer Vorteil besteht hier in der Möglichkeit diese Gefäße vor ihrer Beschichtung antiviral zu behandeln. Dies ist möglich, da die Gefäßwand der erfindungsgemäß hergestellten Gefäße eine deutlich 15 höhere mechanische Stabilität aufweist, als beispielsweise die Wand eines kryopräservierten Gefäßes.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt nach erfindungsgemäßer Auswaschung komplexer Organe die Repopularisierung dieser Organe mit Zellen in organspezifischen 20 dreidimensionalen Rotationsapparaturen. Derartige Rotationsapparaturen sind kommerziell erhältlich (Rotary Cell Culture SystemTM der Firma Synthecon, Inc, USA).

Es ist weiterhin möglich Gefäße, die mit Patienten-autologen Endothelzellen auf der Innenoberfläche ausgekleidet sind, wobei die Endothelzellen aus anderen Quellen (z.B. 25 peripheres Blut, Knochenmark, Fettgewebe, gentechnisch verändertes oder hergestelltes Endothel, xenogenes und gegebenenfalls gentechnisch verändertes xenogenes Endothel) gewonnen worden sind, erfindungsgemäß zu verwenden.

Darüber hinaus kann Patienten-autologes Epithel gentechnologisch hergestellt werden, so dass Epithel erhalten wird, das das Patienten-autologe Epithel in seinen Oberflächeneigenschaften bzw. immunologischen Eigenschaften imitiert.

5 In einer weiteren Ausführungsform (detailliert beschrieben in den Beispielen 15-17) wird eine Vorbeschichtung künstlicher Oberflächen mit Zellpopulationen durchgeführt, die befähigt sind, extrazelluläre Matrix zu bilden und anschließend erfolgt die Überführung der so vorbehandelten Oberflächen in das erfindungsgemäße Verfahren.

10 Die weitere Behandlung der so erzeugten Oberflächen kann durch Methoden des "Tissue Engineerings" oder der anorganischen oder organischen Chemie (z.B. chemische Ankoppelung von antithrombogenen Verbindungen) erfolgen. Weiterhin kann eine Weiterbehandlung mit unterstützenden Substanzen, wie z.B. Adhäsionsmolekülen erfolgen.

15 In einer weiteren Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Hohlorgan zusätzlich auf der Außenoberfläche von einem Mantel aus einem synthetischen Material umschlossen. Dieses synthetische Mantel kann aus einem resorbierbaren Material bestehen, beispielsweise aus synthetischer Polyglyconsäure. Hohlorgane, die von einem Mantel aus synthetischem Material umgeben sind, weisen den Vorteil auf, dass sie für mehrere Monate stabilisiert sind.

20 Im Vergleich zu bislang veröffentlichten Ergebnissen zur Antithrombogenität von Bindegewebe zeigen die erfindungsgemäßen Organe und Gewebe eine deutliche geringere Thrombogenität. Abb. 4a und b zeigen eine erfindungsgemäße Vene, die 16 Stunden nach ihrer Implantation in einen Patienten wieder entnommen wurde. Sie zeigt eine vollkommen glatte Oberfläche ohne jedwede Anheftung von Fibrin, Thrombo-, und
25 Leukozyten. Die bei dieser Operation ebenfalls verwendeten körpereigenen Arterien und Venen waren allesamt von Thrombo- und Leukozyten Anlagerungen (Fig 4c) überzogen und vollständig thrombosiert.

30 Die erfindungsgemäß hergestellten Organe können im gesamten Bereich der Medizin und Veterinärmedizin, der Chirurgie, insbesondere in der Herz- und Gefäßchirurgie

verwendet werden. Besondere Verwendung finden unbeschichtete oder beschichtete erfindungsgemäße Gefäße als aortokoronare Bypässe bei koronarer Herzkrankheit und als Gefäßtransplantate bei Gefäßrekonstruktionen jeglicher Art. Dies betrifft z.B. die periphere arterielle Verschlusskrankheit, aneurysmatische Veränderungen an Gefäßen, die einen Ersatz dieser Gefäße notwendig machen, sowie sämtliche Wiederholungsoperationen am Herzen und an den Gefäßen. Insbesondere sind diese Gefäße das ideale Conduit für den Einsatz in infizierten Körpergebieten. Weitere Indikationen für den Einsatz derartiger Gefäße stellen eine Vielzahl angeborener Missbildungen dar (beispielhaft seien jegliche Formen von Shuntoperationen erwähnt).

10 Zusätzlich eignen sich derartige Gefäße zu grundlagenwissenschaftlichen Untersuchungen wie z.B. Arterioskleroseforschung oder Permeationstestung von Pharmaka. Von besonderem Vorteil ist die Möglichkeit, unbeschichtete Gefäße jederzeit, ohne jede Vorbehandlung, implantieren zu können. Hierdurch wird auch eine klinische Vorratshaltung derartiger Gefäße, wie beispielsweise bei künstlichen

15 Prothesen bekannt, ermöglicht. Der erfindungsgemäße Herstellprozess stellt somit erstmalig in der Geschichte der Medizin einen jederzeit verfügbaren organischen Alternativbypass zur Verwendung am Herzen zur Verfügung.

20

Die Figuren dienen der Erläuterung der Erfindung.

Abbildung 1 zeigt ein Kultivationsgerät (Bioreaktor) zur Verwendung bei dem erfindungsgemäßen Verfahren. Es besteht durchgängig aus biologisch inerten, autoklavierbaren Teilen und durch dieses Gerät kann ein beliebiger Druckgradient über

25 die Venenwand aufgebaut werden. Des weiteren kann die Vene mit beliebigem Druck und Fluss mit Hilfe einer Pumpe perfundiert werden.

Das Kultivationsgerät umfasst ein mit Medium gefülltes Kulturgefäß (1), in dem sich

30 das Hohlorgan befindet (z.B. eine Vene (2)). Das Lumen der beiden Venenenden ist

mittels zweier Adapter (3) mit den beiden Auslässen des Kulturgefäßes verbunden. Ein Adapter ist mit einer Computer-kontrollierten peristaltischen Pumpe verbunden (7). Der andere Adapter endet an einem Vorrats- oder Abwurfgefäß (5) mit einem Steigrohr (4). Stellt das Gefäß (5) ein Abwurfgefäß dar, muss die Leitung (6) an ein Vorratsgefäß
5 angeschlossen werden. Der Druckgradient Δp (abhängig vom Steigrohr (4) und Druckgeber (8)) wird nach gewünschtem Druckgradienten über die Gefäßwand eingestellt. Ist der durch das Steigrohr (4) gebildete Druck ausreichend, kann die Apparatur auch ohne Druckgeber (8) benutzt werden. Durch die peristaltische Pumpe (7) kann computergestützt ein Mediumwechsel im Innenlumen der Vene durchgeführt
10 werden oder eine kontinuierliche/diskontinuierliche Perfusion des Gefäßes (2). Druckleitung (9), Zugangsports (10).

In **Abbildung 2** ist das Wachstumsverhalten von kultivierten humanen makrovaskulären Endothelzellen aus der Vena Saphena magna unter verschiedenen
15 Kultivationsbedingungen und täglichem 50% Mediumwechsel dargestellt.

- a) Kultivation der Zellen in Medium MCDB131 mit 20% Pool Serum.
- b) Kultivation der Zellen in Medium MCDB131 mit 20% autologen Serum.
- c) Kultivation der Zellen in Medium MCDB131 mit 20 % Poolserum + 10 ng/ml rbFGF.
- 20 d) Kultivation der Zellen in Medium MCDB131 mit 20% erfindungsgemäßen Wachstumsfaktorenreichen autologen Serum (aus Plättchenreichem Plasma: 2 Millionen Plättchen/ml).

Es ist ersichtlich, dass das erfindungsgemäße Medium (d) die weitaus besten
25 Kulturbedingungen für menschliche Endothelzellen bietet.

Abbildung 3 zeigt eine Modifikation des Kultivationsgerätes in **Abbildung 1** zur erfindungsgemäßen druckabhängigen Spülung eines Hohlorgans. Hierbei findet keine Mediumrezirkulation statt (vgl. **Abbildung. 1**). Das Vorratsgefäß I (11) beinhaltet die

Flüssigkeit, die in das Innenlumen des Hohlorgans (2) unter Druck (abhängig vom Steigrohr (4) und Druckgeber (9)) über die Pumpe (7) appliziert wird und im Abwurfgefäß I (5) aufgefangen wird. Das Vorratsgefäß II (12) beinhaltet die Flüssigkeit, die der Umspülung des Hohlorgans (2) mit Hilfe der Pumpe (8) dient und im
5 Abwurfgefäß II (6) mit der über die Wand des Hohlorgans filtrierte Flüssigkeit gesammelt wird. Druckleitung (10), Zugangsports (13), Sterilfilter (14).

Abbildung 4 zeigt eine erfindungsgemäße Vene nach Implantation im Vergleich zu einer körpereigenen Vene. Die Abbildungen 4a und 4b zeigen eine erfindungsgemäße
10 Vene, die 16 Stunden nach ihrer Implantation in einen Patienten wieder entnommen wurde. Sie zeigt bei histologischer Evaluierung eine vollkommen glatte Oberfläche ohne jedwede Anheftung von Fibrin, Thrombo- und Leukozyten. Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 4c die Innenoberfläche einer bei dieser Operation ebenfalls verwendeten körpereigenen Vene. Sie war vollständig thrombosiert und zeigte bei
15 histologischer Evaluierung Fibrin, Thrombo- und Leukozytenauflagerungen.

In Abbildung 5 sind die Platzdruckwerte von a) frisch entnommenen Venen, b) kryopräservierten Venen unmittelbar nach dem Auftauen und c) erfindungsgemäßen Venen nach 12 monatiger erfindungsgemäßer Lagerung dargestellt.

20 **Abbildung 6** zeigt ein Ablaufschema zur Gewinnung von autologen Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmolekülen.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht als einschränkend aufzufassen.

25

Beispiel 1: Einleitung der Devitalisierung und Konservierung bei Blutgefäßen

Spendervenen werden nach herkömmlicher Technik vom Organspender steril entnommen. Diese Gefäße werden auf ihre Integrität hin noch im Operationssaal

untersucht. Etwaige Abgänge oder Seitenäste der Venen werden mit chirurgischen Nahtmaterial (z.B. Ethibond 4/0) in üblicher Technik ligiert. Die Gefäße werden mehrfach mit kristalloider Lösung (z.B. Bretschneiderscher Kardioplegischer Lösung oder Medium 199 (Seromed)) gespült und anschließend in ein Röhrchen von ca. 1 cm

5 Kaliber verbracht (hierzu kann wahlweise ein steriles Kunststoffröhrchen oder ein speziell hierzu hergestelltes Glasgefäß verwendet werden). Das Gefäß wird bis zum Überlaufen mit Medium 199 gefüllt und anschließend bei 4°C in Dunkelheit gelagert. Wahlweise können die Venen auch mit Medium 199 gefüllt werden, an beiden Enden beispielsweise mit Gefäßclips verschlossen werden und anschließend in Medium 199

10 gelagert werden. Dies hat den Vorteil, dass das Gefäß, wenn es entnommen wird, nicht mehr kollabiert. Die Lagerung sollte mindestens 2 Wochen, bevorzugt 6 Wochen, besonders bevorzugt 6 Monate betragen. Das Gefäß ist selbst nach einer Lagerzeit von über 24 Monaten noch uneingeschränkt für seine erfindungsgemäße Verwendung geeignet. Das Gefäß kann nach einem mikrobiologischen Test mit nachgewiesener

15 Sterilität und erfindungsgemäßen Spülungen nach Entnahme aus dem Lagerungsgefäß sofort implantiert werden. Nach Belieben kann die Innenoberfläche des Hohlorgans vor der Implantation mechanisch geglättet werden. Hierzu kann ein handelsüblicher Ballonkatheter (Fogarty-Katheter) durch das Hohlorgan gezogen werden. Dieses Verfahren empfiehlt sich, da lagerungsbedingte Unebenheiten nicht ausgeschlossen

20 werden können.

Beispiel 2:

Erfindungsgemäße Aufbereitung von Spendervenen gemäß Beispiel 1 mit einer Lagerzeit von 6 Monaten. Dadurch wird ein devitaler "steady-state" erreicht.

25

Beispiel 3:

Erfindungsgemäßes Verfahren gemäß Beispiel 2 bei einem pH-Wert von 7,0 und einer Temperatur von 18 - 22 °C.

30

Beispiel 4: Patienten-autologe Endothelialisierung von erfindungsgemäß veränderten Venen

Bei den zu operierenden Patienten werden im präoperativen Verlauf ca. 500 ml Vollblut
5 ohne gerinnungshemmende Substanzen entnommen, bei 4°C für 24 Stunden gelagert
und anschließend werden die festen Bestandteile abzentrifugiert. Das Serum wird bis
zur weiteren Verwendung tiefgeköhlt.

In einer Voroperation wird bei dem Empfänger der zu beschichtenden Vene in lokaler
10 Anästhesie ein etwa 5 cm langes Venenstück entnommen. Die Zellisolierung und
Vermehrung isolierter Endothelzellen erfolgt nach gängigen Zellkulturtechniken (Jaffe
EA, Nachman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cells derived from
umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest
52: 2745-56, 1973). Als Kulturmedium kann beispielsweise Medium 199 (Seromed)
15 supplementiert mit 20% autologem Serum und 2 ng/ml rekombinatem bFGF (basic
fibroblast growth factor) verwendet werden. Nach dem Erreichen einer für die
Beschichtung ausreichenden Zellzahl wird die gelagerte, zu verwendende
erfindungsgemäße Spendervene aus ihrem Lagerungsbehälter entnommen. Die Vene
wird entweder direkt, ohne jede weitere Vorbehandlung (siehe unten) mit der Patienten-
20 autologen Endothelzell-Suspension gefüllt oder aber zunächst mit Patienten-autologem
Serum gefüllt und dann im Brutschrank im gefüllten Zustand für 12 bis 24 Stunden bei
37°C inkubiert. Hierfür werden die beiden Enden der Vene mit einem durchgängigen
Adapterstopfen (der eingebunden wird) versehen, der selbst wiederum durch einen
wiederentfernbaren Stopfen verschlossen wird. Im Anschluss wird durch Entfernung der
25 Stopfen das Serum abgelassen, die vorbeschichtete Vene mit einer definierten Zellzahl
(80.000-120.000 Zellen/cm² Graftoberfläche) Patienten-autologen Endothels gefüllt und
durch Wiedereinführen der Stopfen verschlossen. Nun wird die Vene für mehrere
Stunden in einem Rotationsgerät [Kadletz M, Moser R, Preiss P, et al. In vitro lining of
fibronectin coated PTFE grafts with cryopreserved saphenous vein endothelial cells.
30 Thorac Cardiovasc Surg, 35 Spec No 2: 143-147, 11/1987]) im Brutschrank bei 37°C
rotiert. Dabei kommt es zur gleichmäßigen Adhäsion der Zellen auf der

Graftinnenoberfläche. Danach wird die beschichtete Vene dem Rotationsgerät entnommen und in das spezielle Kultivationsgerät (siehe Fig. 1 und 3) eingebracht.

Beispiel 5: Patienten-autologe Endothelialisierung von erfindungsgemäß veränderten
5 Venen unter Verwendung von Patienten-autologen Wachstumsfaktoren und
Adhäsionsmolekülen:

Die Endothelialisierung von erfindungsgemäß vorbehandelten Allografts wurde gemäß dem Verfahren des Beispiels 2 durchgeführt. Im Unterschied zu Beispiel 2 wurde jedoch
10 zur Vorbeschichtung erfindungsgemäß autologes wachstums- und adhäsionsfaktorenreiches Serum eingesetzt und zur Kultivation der Zellen mit erfindungsgemäß autologem wachstumsfaktorenreichen Serum substituiertes Kulturmedium (MCDB 131 + 20 % erfindungsgemäßes Serum).

15 Herstellung des autologen wachstums- und adhäsionsfaktorenreichen Serums:

Bei den zu operierenden Patienten werden im präoperativen Verlauf ca. 500 ml Vollblut mit gerinnungshemmenden Substanzen (bevorzugt Citrat) entnommen. Gewinnung von plättchenreichem Plasma (Plasma mit angereicherten Blutplättchen (Thrombozyten))
20 durch vorsichtige Zentrifugation (315g für 10 Minuten) und Abpipettieren des Überstandes (Plättchen-reiches Plasma). Freisetzung der autologen Wachstumsfaktoren durch Degranulation der Plättchen nach Rekalzifikation und Aktivierung mit Vollblut (1 ml Vollblut auf 10 ml Plättchenreiches Plasma). Bevorzugt angereicherte Wachstumsfaktoren können durch vorheriges Ankonzentrieren der Plättchen auf z.B. 2
25 Million/ml und anschließender Aktivierung s.o. gewonnen werden. Wahlweise kann dieses erfindungsgemäße Serum unter Verwendung von handelsüblichen Konzentratoren durch Entzug von Wasser ankonzentriert werden (z.B. Dextranomer, Polyacrylamid). Dextranomer und Polyacrylamid Konzentratoren sind kommerziell erhältlich (Sephadex von Pharmacia, Bio-Gel P von Bio-Rad Laboratories). Alternativ

können andere Konzentratoren wie Silika-Gel, Zeolites, Dextramines, Alginate Gel, "crosslinked" Agarose verwendet werden.

- 5 Gegebenfalls kann das gewonnene Gemisch auch gegen physiologische Lösungen (Hanks Salze, Earle's Salze, Basalmedien) dialysiert werden.

Beispiel 6: Patienten-autologe Endothelialisierung von erfindungsgemäß vorbehandelten Xenografts:

- 10 Die Endothelialisierung von erfindungsgemäß vorbehandelten Xenografts wird entsprechend dem Verfahren des Beispiels 4 oder 5 durchgeführt.

Beispiel 7: Patienten-autologe Endothelialisierung von einem anderen Gefäß, z.B. einer Arterie

15

Die Endothelialisierung einer Arterie wird genauso durchgeführt wie die im Beispiel 4 oder 5 beschriebene Endothelialisierung einer Vene.

Beispiel 8: Epithelialisierung von einem anderen Hohlorgan, nämlich von einem Harnleiter.

20

Die Epithelialisierung von einem Harnleiter wird entsprechend der im Beispiel 4 beschriebenen Endothelialisierung durchgeführt, mit dem Unterschied, dass statt Endothel Urothel verwendet wird.

25

Beispiel 9: Beschichtungsverfahren, wobei die Endothelzellen aus anderen Quellen (s. o.) gewonnen werden

Beschichtungsverfahren wie Beispiel 4. Die Isolation der entsprechenden Endothelzellen erfolgt aus peripherem Blut, Knochenmark und Bauchfett nach bekannten Methoden. Diese Isolierung von Endothelzellen hat für Patienten einen
5 deutlichen Nutzen, da diese Verfahren auch für solche Patienten verfügbar sind, die über kein ausreichendes vaskuläres Substrat für die Gewinnung von autologem Endothel verfügen. Zusätzlich sind diese Verfahren weniger invasiv für den Patienten.

Die nachfolgenden Beispiele beziehen sich auf die Verwendung der erfindungsgemäßen
10 Medien (mit autologen Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmolekülen supplementierte Medien) bei der Zellkultur für das Tissue-Engineering.

Beispiel 10: Isolation und Kultivation humaner makrovaskulärer venöser und arterieller Endothelzellen:

15

Die Isolierung erfolgt wie oben beschrieben nach der Methode Jaffe et al. Die Kultivation der Zellen erfolgt vorzugsweise in Medium MCDB 131 mit 20% autologem thrombozytärem Wachstumsfaktoren-reichen Serum (aus 2×10^6 Blutplättchen/ml) substituiert zusätzlich mit Heparin (50 µg/ml).

20 Beispiel 11: Isolierung und Kultivation von humanen glatten Muskelzellen aus der Media der Aorta

Es existieren zwei Verfahren zur Isolierung von glatten Muskelzellen aus der Media der Aorta:

- 25 1. Auswachsen der glatten Muskelzellen aus Explantatstücken der Media
oder
2. Enzymatische Desintegration von Media. Bevorzugt wird die Möglichkeit 2 aufgrund höherer Zellausbeuten.

Stücke humaner Aorta werden chirurgisch von der Intima und von der Adventitia befreit. Die gewonnene Media muss frei sein von Resten der Intima und der Adventitia. Die Media wird mechanisch in 5 mm große Stücke zerkleinert und anschließend mit
5 einem Proteasegemisch (0,05% Elastase Typ III, 0,225% Kollagenase, 1% Humanalbumin in PBS) inkubiert. Für ein Gramm Gewebe wird mindestens 10 ml Proteaselösung verwendet. Es wird solange bei 37°C inkubiert, bis das Gewebe vollständig verdaut ist (im allgemeinen 3-5 h). Nach vollständiger Verdauung wird die
10 Zellsuspension über ein Nylonnetz (50µm) filtriert, zentrifugiert (190g, 10 min) und in autologem Kulturmedium (M199 + 20% autologes wachstumsfaktorenreiches Serum) resuspendiert. Die Zellen werden in einer Dichte von 10^4 Zellen/cm² ausgesät und bei 5% CO₂, 37°C im Brutschrank inkubiert.

Beispiel 12: Isolation und Kultivation humaner Keratinozyten

15

Zur Isolierung von humanen Keratinozyten können die im Rahmen von Operationen übriggebliebenen Hautresektate verwendet werden. Für den Transport des Hautstücks wird ein Basalmedium (z.B. DMEM) mit einem Antibiotikazusatz (z.B. Gentamicin 50 ng/ml) zur Reduktion der natürlichen Hautflora und Prophylaxe einer Sekundärinfektion
20 supplementiert.

Von der Haut werden zunächst eventuell vorhandene Haare und nekrotisches Gewebe entfernt, danach wird das Fettgewebe und Gefäße der Subcutis vorsichtig abgetrennt. Zur Dissoziierung wird die gesäuberte Haut für 18 Stunden bei 4°C in eine Trypsin/EDTA-Lösung (0,25%/0,2%) gelegt. Die 18-stündige Enzymeinwirkung auf die
25 Haut wird deutlich durch ihre geleeartige Beschaffenheit. Um die Haut von restlicher Trypsin/ EDTA Lösung zu befreien, wird sie mit PBS gewaschen. Danach wird das dissoziierte Gewebe mit Pinzetten von der Haut entfernt und in Nährmedium suspendiert. Diese Zellsuspension wird durch eine sterile Mullkompressen (oder auch ein Nylonnetz 50 µm Maschenweite) filtriert um nekrotische Gewebetrümmer zu entfernen.
30 Die Zellsuspension wird zentrifugiert (190 g, 10 min) und in autologem Nährmedium

resuspendiert. Anschließend werden die Zellen in Zellkulturschalen ausgesät. Bei 5% CO₂-Begasung und 37°C wird die Primärkultur für 24 Stunden im Brutschrank aufbewahrt. Nach Ablauf der 24 Stunden, in denen sich die Zellen am Flaschenboden festsetzen können, wird das Medium gewechselt. Mediumwechsel erfolgt alle 3 Tage.

5

Als Kulturmedium wird das Kulturmedium MCDB 153 (Boyce ST, Ham RG. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol.* 1983;81:33s-40s) substituiert mit Insulin (5 mg/l), Hydrocortison (1,4 µM, 0,5 mg/l), Ethanolamin
10 (0,1 mM), Phosphoethanolamin (0,1 mM) mit 10% autologem Serum und 10% autologer thrombozytärer Wachstumsfaktoren (aus 2x10⁶ Thrombozyten/ml) verwendet.

Beispiel 13: Isolation und Kultivation humaner dermaler Fibroblasten

15 Nach Isolierung der Keratinozyten wird die restliche Haut in eine Kulturflasche mit autologem Nährmedium (M199 mit 10 % autologem wachstumsfaktorenreichen Serum) gegeben. Nach wenigen Tagen Inkubation im Brutschrank (5% CO₂, 37°C) wachsen Fibroblasten aus der Haut heraus. Nachdem genügend Fibroblasten aus der Haut ausgewachsen sind, wird die Resthaut entfernt. Mediumwechsel erfolgt alle 3 Tage.

20

Beispiel 14: Kultivation von humanen Hepatozyten

Isolation von humanen Hepatozyten erfolgt nach der Methode Berry et al. (Berry MN et al., High-yield preparation of isolated hepatocytes from rat liver. In *Laboratory*
25 *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vo. 21 (ed. RH Burdon and PH van Knippenberg), pp. 15-58. Elsevier: Amsterdam, New York, Oxford, 1991).

Die Aussaat der Zellen erfolgt in einer Dichte von 1,6 x 10⁵ Zellen/cm² in Kulturflaschen. Als Kulturmedium wird William's E Medium (Gibco, Grand Island,

NY, USA) substituiert mit 15% autologem wachstumsfaktoren- und adhäsionsmolekülenreichen (Wachstumsfaktoren aus 2×10^6 /ml Thrombozyten und 7×10^5 /ml Leukozyten) Serums, 25 mM HEPES, 5 µg/ml Insulin, 0,5 µg/ml Hydrocortison, 5 µg/ml Transferrin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin verwendet. Ein
5 50%iger Mediumwechsel erfolgt alle 24 Stunden.

Beispiel 15: Beschichtung einer künstlichen Oberfläche (hier PTFE-Prothese, Durchmesser 4 mm) mit Fibroblasten und anschließender erfindungsgemäßer Weiterbehandlung.

10

Isolierung und Kultivierung von Fibroblasten siehe Beispiel 13. Die zu beschichtende sterile PTFE-Prothese wird in autologes Serum eingelegt, wobei darauf geachtet wird, dass das Innenlumen der Prothese komplett mit dem Serum benetzt wird. Die Prothese wird anschließend für ca. 12 Stunden bei 37 °C gelagert. Anschließend wird die
15 Prothese entnommen und mit einer Fibroblastenzellsuspension ($100000 \text{ Zellen/cm}^2$ innere Prothesenoberfläche) gefüllt. Die Prothese wird nun für 6 – 10 Stunden in einer Rotationsapparatur (siehe auch Bsp. 4) rotiert um eine gleichmäßige Adhäsion der Zellen zu gewährleisten. Anschließend wird die beschichtete Prothese in einen Bioreaktor überführt und dort 4 Wochen lang weiterkultiviert bis sich eine von den
20 Fibroblasten gebildete, dem Innenlumen fest anliegende, Schicht extrazellulärer Matrix von einer Schichtdicke von mindestens 10 µm gebildet hat. Anschließend wird die beschichtete Prothese erfindungsgemäß in einen devitalen Steady State überführt. Nach erfindungsgemäßen Erreichen des devitalen Steady State kann die Prothese entweder sofort implantiert oder im Rahmen des Tissue Engineerings weiterverarbeitet werden.

25

Beispiel 16: Beschichtung einer künstlichen Oberfläche (hier Polyurethan-Prothese, Durchmesser 4 mm) mit subintimalen Zellen und anschließender erfindungsgemäßer Weiterbehandlung.

Die Isolierung subintimaler Zellen erfolgt aus Gefäßen, welchen zuvor nach oben
30 beschriebener Methode die Endothelzellen proteolytisch isoliert wurden (siehe Beispiel

- 10). Durch eine sich anschließende weitere 15-minütige proteolytische Desintegration der verbliebenen Zellen (= subintimale Zellen) auf der Innenoberfläche der Gefäße mit derselben Proteaselösung (Kollagenase) werden diese aus ihrem Zellverband herausgelöst und durch Ausspülen des Gefäßsegments gewonnen. Diese Zellen werden
5 wie in Beispiel 13 kultiviert. Die weitere Beschichtung erfolgt analog Beispiel 15.

Beispiel 17: Endothelialisierung einer erfindungsgemäß vorbehandelten beschichteten künstlichen Oberfläche (hier PTFE-Prothese, 4 mm Durchmesser).

- Eine gemäß Beispiel 15 vorbereitete PTFE-Prothese wird nach erreichtem "devitalen
10 steady state" gemäß Beispiel 4 endothelialisiert.

15

20

25

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Devitalisierung und Konservierung von Organen und/oder Geweben, umfassend die folgenden Schritte:
 - a) sterile Entnahme und lagern des Organs oder des Gewebes bis zum Erreichen der Devitalisierung in einer Flüssigkeit, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: sterilem Wasser, einer kristalloiden Flüssigkeit, einer kolloidalen Flüssigkeit, einer lipidhaltigen Flüssigkeit oder einer Kombination der genannten Flüssigkeiten,
 - b) auswaschen von Zelltrümmern, zellulären Abbauprodukten sowie löslichen Stoffen unter Druck mit einer Flüssigkeit, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: sterilem Wasser, einer kristalloiden Flüssigkeit, einer kolloidalen Flüssigkeit, einer lipidhaltigen Flüssigkeit und einer Kombination der genannten Flüssigkeiten.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die sterile Entnahme des Organs und/oder Gewebes von Toten (Multiorganspendern) erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Lagerung für mindestens 2 Wochen, vorzugsweise 6 Wochen, insbesondere bevorzugt 6 Monate im Dunkeln erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Lagerung unter sterilen Bedingungen erfolgt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Flüssigkeit in der die Lagerung erfolgt eine kristalloide Flüssigkeit ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die kristalloide Flüssigkeit Medium 199 (Seromed) ist.
7. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die kristalloide Flüssigkeit Bretschneidersche Kardioplegische Lösung ist.
8. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die kristalloide Flüssigkeit einen Antibiotikazusatz enthält.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Verfahren vor der Lagerung ein mehrfaches Spülen in der gleichen Flüssigkeit umfasst, in der die Lagerung erfolgt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Lagerung und Auswaschung der Organe und/oder Gewebe mit der gleichen Flüssigkeit erfolgt.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Lagerung bei einem pH-Wert von 3 bis 9 erfolgt.
12. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Lagerung bei einem pH-Wert von 6,9 bis 7,8 erfolgt.
13. Verfahren nach Anspruch 10, wobei die Lagerung bei einem pH-Wert von 7,0 bis 7,5 erfolgt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die Lagerung bei einer Temperatur von 0 bis 55°C erfolgt.

15. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Lagerung bei einer Temperatur von 0 bis 37°C erfolgt.
- 5 16. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Lagerung bei einer Temperatur von 4°C erfolgt.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei die Lagerung unter reduziertem Sauerstoffdruck erfolgt.
- 10 18. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die Lagerung unter anaeroben Bedingungen erfolgt.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-15, wobei die Lagerung mit Gasen (in der flüssigen oder gasförmigen Phase) erfolgt.
- 15 20. Verfahren nach Anspruch 18, wobei das Gas ein Edelgas ist.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, wobei das Auswaschen pulsierend erfolgt.
- 20 22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei das Auswaschen von Zelltrümmern, zellulären Abbauprodukten, sowie löslichen Stoffen mehrfach erfolgt.
23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei mindestens eine 2-malige Auswaschung erfolgt, vorzugsweise im Abstand von 6 Wochen.
- 25

24. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die erfindungsgemäß behandelten Organe und Gewebe nach Devitalisierung und Konservierung getrocknet werden.

25. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Organe Hohlorgane sind.

5

26. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Auswaschung in einem Kultivationsgefäß erfolgt, umfassend ein mit einer Flüssigkeit gefülltes Kulturgefäß (1), zwei Adapter (3), die mit den beiden Auslässen des Kulturgefäßes verbunden sind, einen Schlauch, der mit einer Pumpe verbunden ist und einen weiteren Schlauch, der an einem Vorrats- oder Abwurfgefäß (5) endet, wobei der Druckgradient Δp abhängig vom Steigrohr (4) und Druckgeber (8) ist.

10

27. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Auswaschung in einem Kultivationsgefäß gemäß Figur 1 erfolgt.

15

28. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Organe und Gewebe ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus: Blutgefäße, Blutgefäßklappen, Lymphgefäße, Lymphgefäßklappen, Harnleiter, Harnblasen, Samenleiter, Bronchien, Lebern, Nieren, Herzen und Herzklappen.

20

29. Organe oder Gewebe erhältlich durch das Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 27.

25

30. Verfahren zur Herstellung von Matrices für den Teil- und Neuaufbau von Organen oder Geweben umfassend die folgenden Schritte:
- a) Devitalisierung und Konservierung von Organen und/oder Geweben nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 27,
- 5 b) Zellrepopulation der Organe und Gewebe, vorzugsweise durch Reendothelialisierung.
31. Verfahren nach Anspruch 29, wobei die Organe Hohlorgane sind.
- 10 32. Verfahren nach Anspruch 30, wobei die Hohlorgane ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus: allogenen Gefäßen, xenogenen Gefäßen und Harnleiter.
33. Organe erhältlich durch das Verfahren gemäß einem der Ansprüche 29 bis 31.
- 15 34. Verfahren nach Anspruch 29, wobei die Repopulationszellen autologe Zellen sind, z.B. autologe Endothelzellen.
35. Verfahren gemäß Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Reendothelialisierung durch Aussaat von Zellen auf der Innenfläche der Hohlorgane erfolgt.
- 20
36. Verfahren gemäß Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass vor der Aussaat der Zellen eine Vorbeschichtung der Hohlorgane mit Adhäsionsmolekülen erfolgt.
- 25
37. Verfahren gemäß Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass vor der Aussaat der Zellen eine Vorbeschichtung der Hohlorgane mit Patienten-autologem Serum erfolgt.

38. Verfahren gemäß Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass vor der Aussaat der Zellen eine Vorbeschichtung der Hohlorgane mit Wachstums- und Adhäsionsfaktorenreichen Serum erfolgt.
- 5 39. Verfahren gemäß Anspruch 30, wobei die natürlichen und künstlichen Hohlorgane ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus: Blutgefäße, Blutgefäßklappen, Lymphgefäße, Lymphgefäßklappen, Harnleiter, Harnblasen, Samenleiter, Bronchien, Herzen und Herzklappen.
- 10 40. Verwendung der Gewebe oder Organe, erhältlich durch das Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 28 in der Medizin und Veterinärmedizin.
41. Verwendung der Gefäße, erhältlich durch das Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 28 in der Herz- und Gefäßchirurgie.
- 15 42. Verwendung der Gefäße, erhältlich durch das Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 28 als aortokoronaler Bypass oder als Gefäßtransplantat bei Gefäßrekonstruktionen.
- 20 43. Verwendung der Gefäße, erhältlich durch das Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 28 bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit, aneurysmatischen Veränderungen der Gefäße, Wiederholungsoperationen am Herzen und an den Gefäßen und bei angeborenen Missbildungen von Gefäßen.
- 25 44. Gewebe oder Organe, erhältlich durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich von einem Mantel aus einem synthetischen Material umschlossen sind.

45. Gewebe oder Organe, erhältlich durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich von einem Mantel aus einem synthetischen resorbierbaren Material umschlossen sind.
- 5 46. Gewebe oder Organe, erhältlich durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 28, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich von einem Mantel aus einem synthetischen resorbierbaren Material, das aus Polyglyconsäure besteht, umschlossen sind.
- 10 47. Kultivationsgerät zur Verwendung in einem Verfahren gemäß Anspruch 1, umfassend ein mit einer Flüssigkeit gefülltes Kulturgefäß (1), zwei Adapter (3), die mit den beiden Auslässen des Kulturgefäßes verbunden sind, einen Schlauch, der mit einer Computer-kontrollierten peristaltischen Pumpe verbunden ist und einen weiteren Schlauch, der an einem Vorrats- oder Abwurfgefäß (5) endet, wobei der Druckgradient Δp abhängig vom Steigrohr (4) und Druckgeber (8) ist.
- 15 48. Kulturmedium zur Steigerung von Wachstum, Remodellierungsvorgängen und Reduktion von Entdifferenzierungsvorgängen von vaskulären Zellen in der Zellkultur, dadurch gekennzeichnet, dass einem basalen chemisch definierten Medium oder einem Vollmedium autologe Wachstumsfaktoren und/oder Adhäsionsmoleküle zugesetzt werden.
- 20 49. Kulturmedium gemäß Anspruch 48, wobei die autologen Wachstumsfaktoren und/oder Adhäsionsmoleküle in Form von autologem, nicht hitzeinaktiviertem Serum zugesetzt wird.
- 25 50. Kulturmedium gemäß Anspruch 48, wobei das Kulturmedium 5-30 % autologes Serum umfasst.

51. Kulturmedium gemäß Anspruch 48, wobei das Kulturmedium 5-20 % autologes Serum umfasst.
52. Kulturmedium gemäß Anspruch 48, wobei das Kulturmedium 10-15 % autologes Serum umfasst.
53. Kulturmedium gemäß Anspruch 48 bis 52, dem zusätzlich rekombinante Wachstumsfaktoren zugesetzt werden.
54. Kulturmedium gemäß Anspruch 48, wobei die autologen Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle aus Blutplättchen hergestellt werden.
55. Kulturmedium gemäß Anspruch 48, wobei die autologen Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle aus weißen Blutkörperchen hergestellt werden.
56. Kulturmedium gemäß Anspruch 48, wobei die autologen Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle aus Blutplättchen und weißen Blutkörperchen hergestellt werden.
57. Kulturmedium gemäß Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, dass die autologen Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle aus geronnenem autologem Vollblut durch Zentrifugation hergestellt werden.
58. Kulturmedium gemäß Anspruch 57, dadurch gekennzeichnet, dass das gewonnene autologe Vollblut für mindestens für 1 Stunde bei 37°C gelagert wird.

59. Kulturmedium gemäß Anspruch 57, dadurch gekennzeichnet, dass das gewonnene autologe Vollblut für mindestens für 6 Stunde bei 4°C gelagert wird.
- 5 60. Kulturmedium gemäß Anspruch 54 und 57, dadurch gekennzeichnet, dass die autologen Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle aus angereicherten Blutplättchen gewonnen werden.
- 10 61. Kulturmedium gemäß Anspruch 53, wobei der rekombinante Wachstumsfaktor bFGF, VEGF, EGF, TGF, Scatter-factor, PDGF oder die Kombination dieser Wachstumsfaktoren ist.
62. Kulturmedium gemäß Anspruch 48 bis 61, wobei dem Medium zusätzlich Glycosaminoglycan zugegeben wird.
- 15 63. Kulturmedium gemäß Anspruch 62, insbesondere wenn das Glycosaminoglycan Heparin, Heparinsulfat, Chondroitin, Chondroitinsulfat, Dermatin oder Dermatinsulfat ist.
- 20 64. Kulturmedium gemäß Anspruch 48 bis 63, wobei dem Medium zusätzlich Transferrin zugegeben wird.
65. Kulturmedium gemäß Anspruch 48 bis 63, wobei dem Medium zusätzlich Hydrocortison zugegeben wird.
- 25 66. Kulturmedium gemäß Anspruch 48 bis 63, wobei dem Medium zusätzlich Insulin zugegeben wird.

67. Kulturmedium gemäß Anspruch 48 bis 63, wobei dem Medium zusätzlich Albumin zugegeben wird.
68. Kulturmedium gemäß Anspruch 48 bis 63, zur Anzucht von vaskulären Zellen, insbesondere Endothelzellen, Perizyten, "Pericyte-like-cells" und glatte Muskelzellen.
69. Kulturmedium gemäß Anspruch 47 bis 63, zur Anzucht nicht vaskulärer Zellen, insbesondere von Hepatozyten.
70. Kulturmedium gemäß Anspruch 48 bis 69, bei Verwendung zum "Precoating" vaskulärer Prothesen, Herzklappen und Bypässe beim "Tissue-Engineering".
71. Kulturmedium gemäß Anspruch 48 bis 70, bei Verwendung als Kultivationsmedium im Rahmen des "Tissue-Engineerings".
72. Kulturmedium gemäß Anspruch 48 bis 71, als Präservationslösung beim "Tissue-Banking".
73. Kulturmedium gemäß Anspruch 48 bis 72, dadurch gekennzeichnet, dass die autologen Wachstumsfaktoren durch mechanische Zerstörung körpereigener Gewebe gewonnen werden.
74. Kulturmedium gemäß Anspruch 48 bis 73, dadurch gekennzeichnet, dass die autologen Wachstumsfaktoren durch chemische und/oder biochemische Zerstörung körpereigener Gewebe gewonnen werden.

75. Anspruch 48 bis 74, dadurch gekennzeichnet, dass die autologen Wachstumsfaktoren durch Apoptose körpereigener Gewebe gewonnen werden.

5 76. Kulturmedium gemäß Anspruch 74, dadurch gekennzeichnet, dass die Gewebeerstörung durch Ultraschall erfolgt.

10

15

20

25

Abb. 1

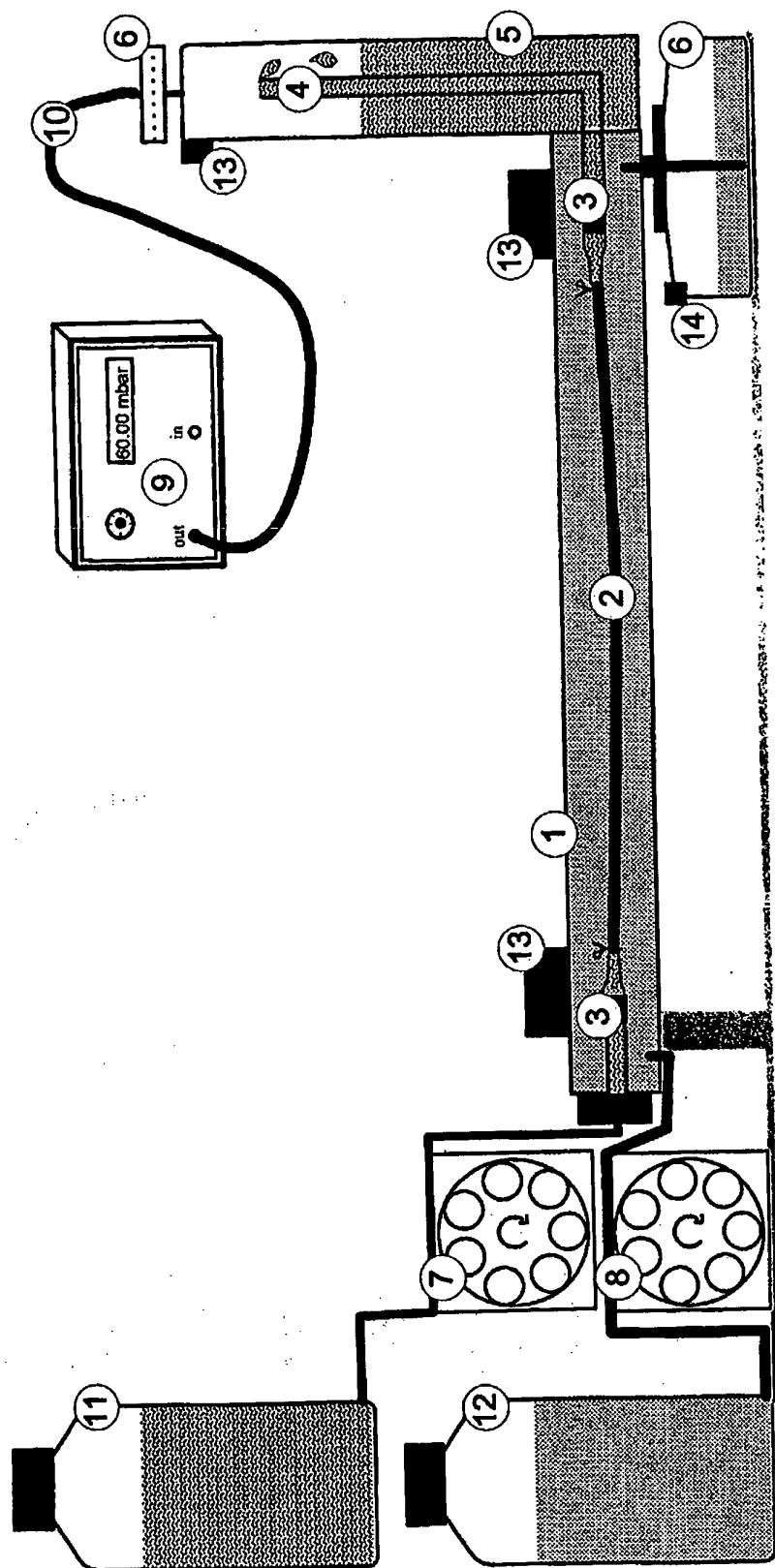
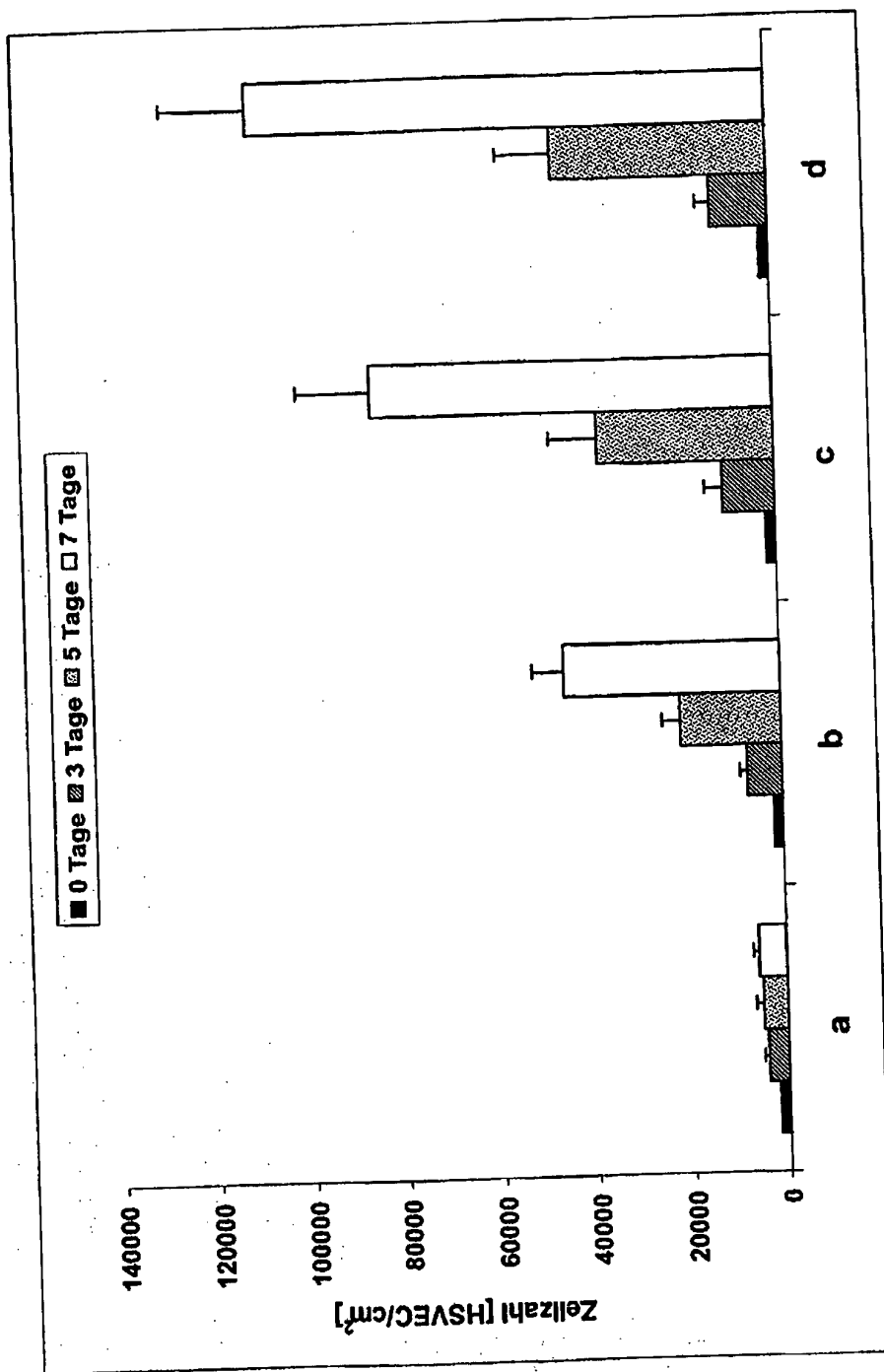


Abb. 2



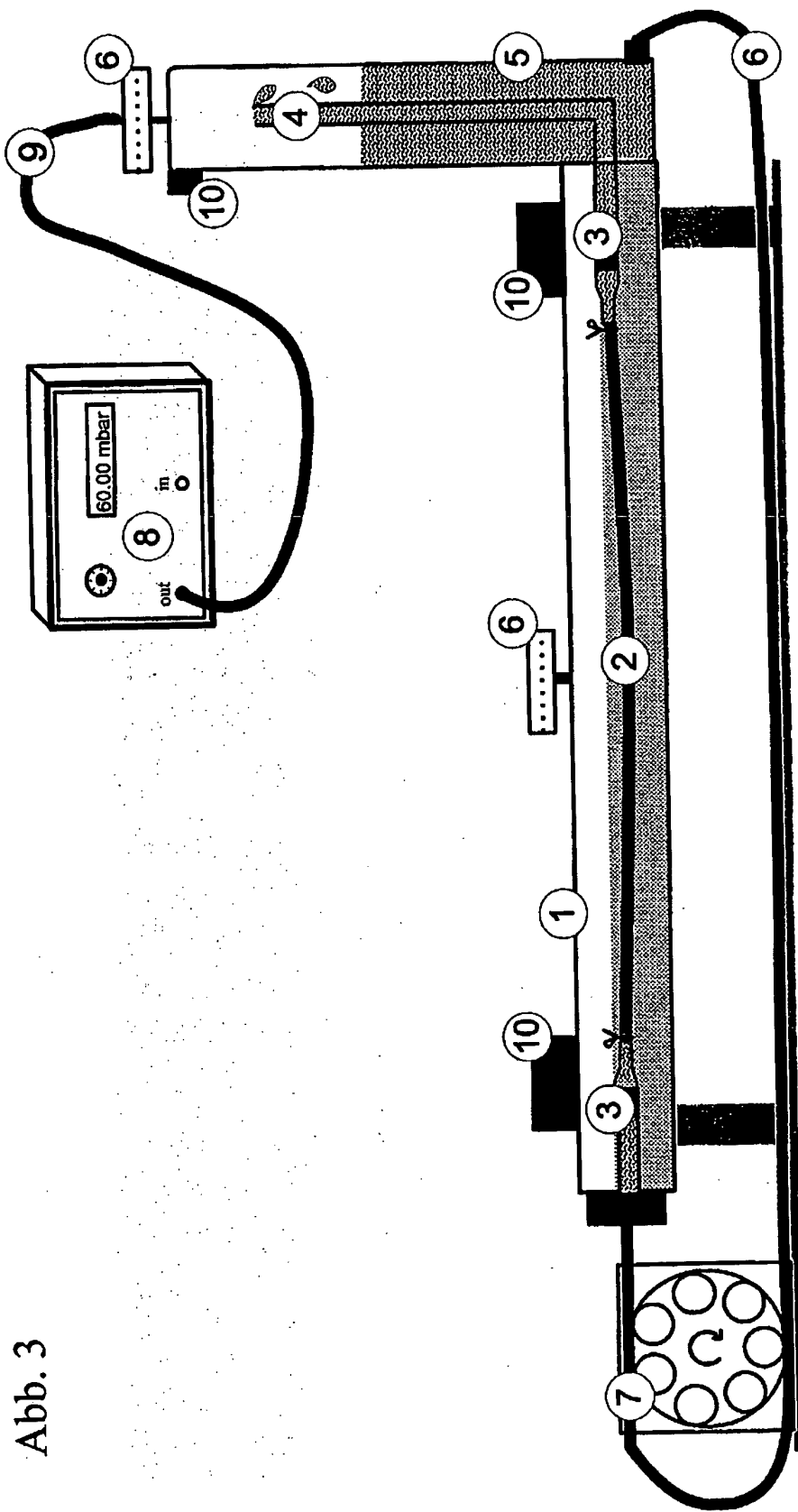
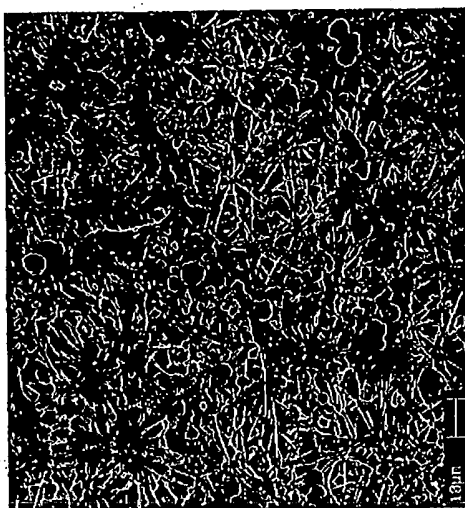
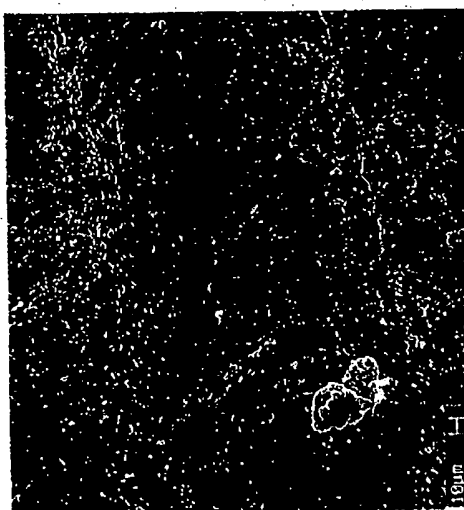


Abb. 3

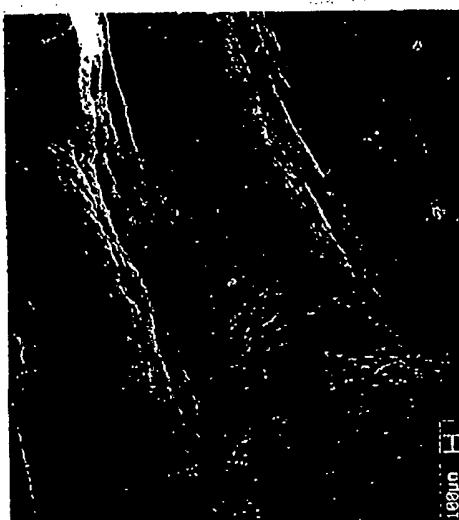
Abb. 4



c



b



a

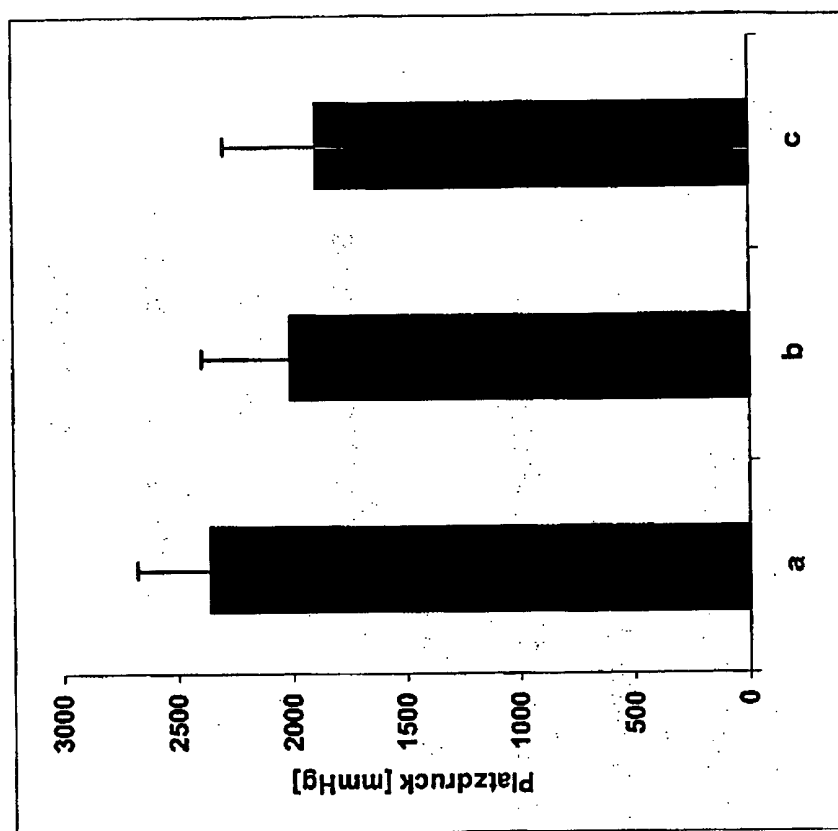
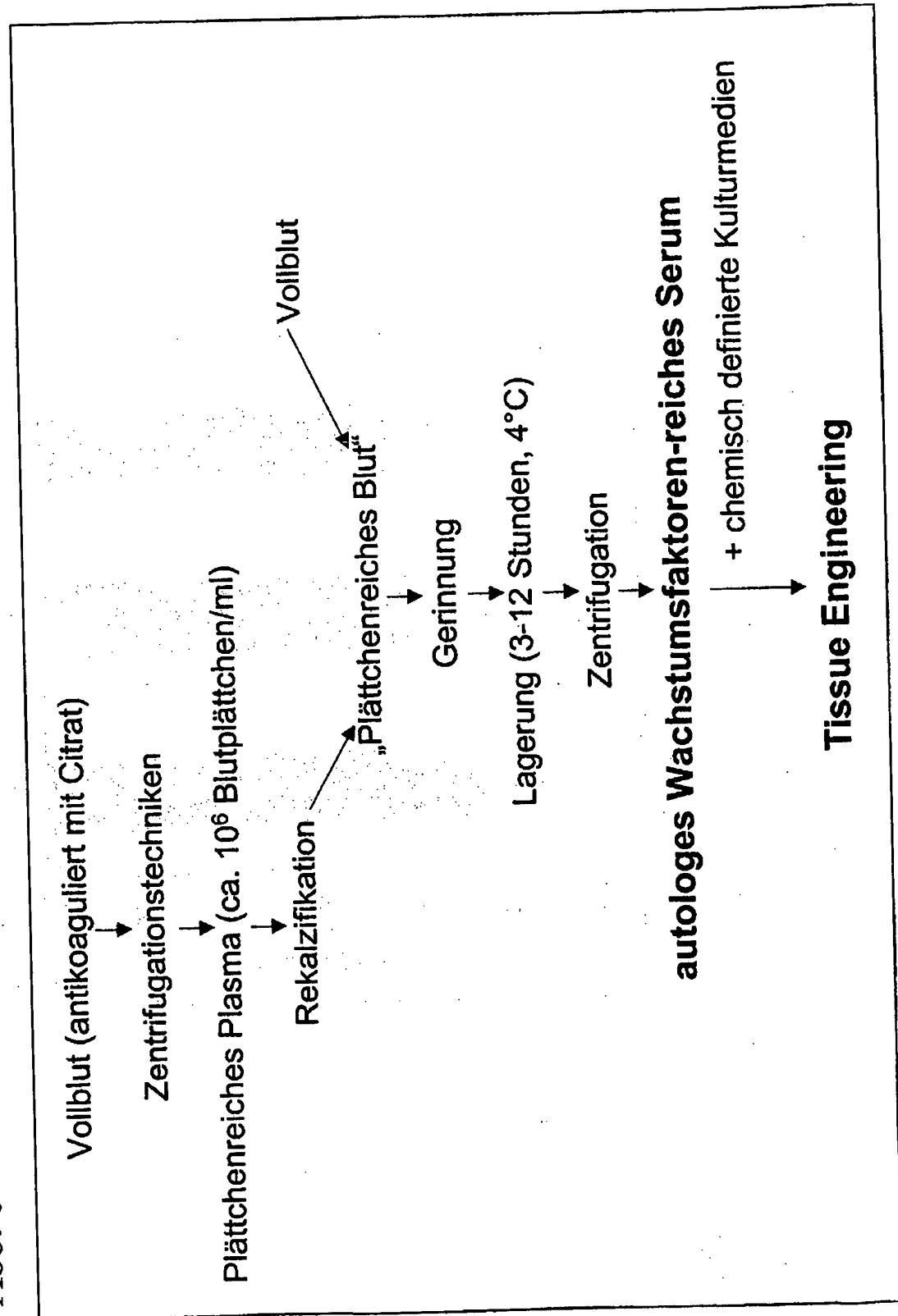


Abb. 5

Abb. 6



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
20. Februar 2003 (20.02.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/013239 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A01N 1/02

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/08781

(22) Internationales Anmeldedatum:
6. August 2002 (06.08.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 38 564.1 6. August 2001 (06.08.2001) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: LAMM, Peter [DE/DE]; Rebhuhnweg 20,
82256 Fürstenfeldbruck (DE). JUCHEM, Gerd [DE/DE];
Boschetsrieder Strasse 61a, 81379 München (DE).

(74) Anwälte: VOSSIUS, Volker usw.; Geibelstrasse 6, 81679
München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,
SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

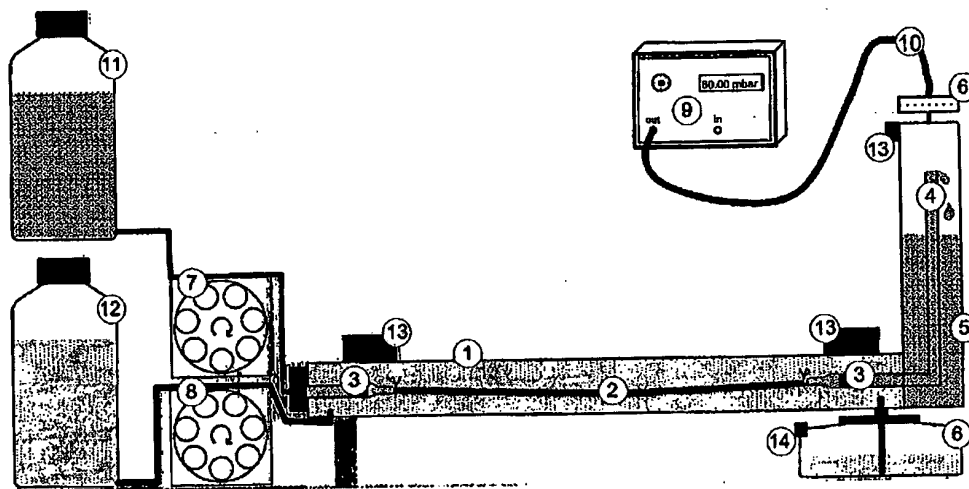
Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR THE DEVITALISATION OF NATURAL ORGANS AND/OR FOR THE PREPARATION OF EX-
TRACELLULAR MATRICES FOR TISSUE ENGINEERING

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR DEVITALISIERUNG NATÜRLICHER ORGANE UND/ODER ZUR BEREITSTEL-
LUNG EXTRAZELLULÄRER MATRICES ZUM "TISSUE-ENGINEERING"



(57) Abstract: The invention relates to methods for devitalising and conserving human and animal organs and tissue, preferably natural hollow organs and the complete components thereof, in particular blood vessels and coronary valves. The invention further relates to methods for production of matrices for the partial and full construction of organs and tissues and furthermore to organs and tissue, in particular natural and artificial hollow organs, which may be obtained by said method. The invention also relates to the clinical application and use of organs thus produced in clinical and veterinary medicine, preferably in coronary and vascular surgery and novel culture media.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts:

2. Oktober 2003

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zur Devitalisierung und Konservierung menschlicher und tierischer Organe und Gewebe, bevorzugt jedoch natürlicher Hohlorgane und deren sämtlicher Bestandteile, insbesondere von Blutgefässen und Herzklappen. Des Weiteren betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung von Matrices für den Teil- und Neuaufbau von Organen und Geweben. Darüber hinaus betrifft die Erfindung Organe und Gewebe, insbesondere natürliche und künstliche Hohlorgane, die nach den erfindungsgemässen Verfahren erhältlich sind. Weiterhin betrifft die Erfindung den klinischen Einsatz und die Verwendung der hergestellten Organe und Gewebe in der Medizin und Veterinärmedizin, vorzugsweise in der Herz- und Gefässchirurgie. Weiterhin betrifft die Erfindung neue Kulturmedien.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/Eur 02/08781A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A01N1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>P. LAMM, G. JUCHEM, P. WEYRICH, S. NEES & B. REICHART: "New alternative coronary bypass graft: first clinical experience with an autologous endothelialized cryopreserved allograft." J. THORAC. CARDIOVASC. SURG., vol. 117, 1999, pages 1217-1219, XP009005643 cited in the application page 1217, column 2, line 5-24; figure 1</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1-76

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 February 2003

Date of mailing of the international search report

05/03/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Klaver, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Internati Application No
 PCT/EP 02/08781

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	P. LAMM, G. JUCHEM, S. MILZ, M. SCHUFFENHAUER & B. REICHART: "Autologous endothelialized vein allograft." CIRCULATION, vol. 104, no. Supp.I, 18 September 2001 (2001-09-18), pages I.108-I.114, XP002231247 the whole document	1-76
X	WO 99 00152 A (HAVERICH AXEL; BADER AUGUSTINUS (DE); STEINHOFF GUSTAV (DE)) 7 January 1999 (1999-01-07) page 1, paragraph 1 page 3, line 9-29 page 6, line 11-27 page 9, line 28 -page 10, line 15 page 12, line 31 -page 13, line 31	1-78
P,X	WO 02 49681 A (DOHMEN PASCAL; AUTO TISSUE GMBH (DE); KONERTZ WOLFGANG (DE)) 27 June 2002 (2002-06-27) page 2, line 1-11 page 3, line 1-30 page 5, line 4 -page 6, line 4; figure 1	1-43,47
P,X	WO 01 92475 A (BADER AUGUSTINUS) 6 December 2001 (2001-12-06) page 5, line 7-26 page 8, line 1-8 page 9, line 14-20 page 11, line 13 -page 12, line 5	48-76
X	EP 0 281 736 A (SULZER AG) 14 September 1988 (1988-09-14) column 5, line 15 -column 6, line 32	1-29
X	WO 91 16009 A (CURATIVE TECH INC) 31 October 1991 (1991-10-31) page 4, line 17-31 page 5, line 35 -page 6, line 4 page 6, line 23 page 7, line 10-17 page 8, line 6-21 page 41, line 28 -page 42, line 12	48-76
X	WO 89 03875 A (UNIV JEFFERSON) 5 May 1989 (1989-05-05) page 7, line 16-22 page 8, line 1-8 page 8, line 35 -page 9, line 2 page 10, line 15-34	48-76
	--- -/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No
PCT/EP 02/08781

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 02 24242 A (FREIER THOMAS ;STEINHOFF GUSTAV (DE)) 28 March 2002 (2002-03-28) page 3, line 34 -page 4, line 23 page 6, line 14-28 page 9, line 5-25	44-46
Y	WO 95 24873 A (CRYOLIFE INC) 21 September 1995 (1995-09-21) cited in the application page 5, line 4-24 page 9, line 20-27 page 15, line 27 -page 16, line 26 page 19, line 15-17 page 21, line 4 -page 22, line 28 page 23, line 22-27	1-43
X	page 26, line 3-6 page 29, line 3-22	48-76
Y	WO 92 15259 A (UNIV COLORADO RES) 17 September 1992 (1992-09-17) cited in the application page 6, line 18-27 page 8, line 17-25	1-43
X	page 9, line 11-13 page 9, line 36 -page 10, line 28	48-52
Y	WO 01 49210 A (CHILDRENS MEDICAL CENTER) 12 July 2001 (2001-07-12) page 3, line 13 -page 4, line 6 page 7, line 1-14 page 10, line 8-26 page 11, line 17-24	1-43
X	page 12, line 3-18; example 1	29
Y	WO 96 32905 A (BISHOPRIC NANETTE H; DOUSMAN LINDA (US); ST JUDE MEDICAL (US); YAO) 24 October 1996 (1996-10-24) page 6, line 13-20 page 7, line 2-14 page 14, line 30 -page 15, line 13; examples 1,4	1-43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat Application No

PCT/EP 02/08781

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9900152	A	07-01-1999	WO 9900152 A2 DE 19828726 A1 DE 59803925 D1 EP 0989867 A2 ES 2175753 T3 JP 2002507907 T	07-01-1999 07-01-1999 29-05-2002 05-04-2000 16-11-2002 12-03-2002
WO 0249681	A	27-06-2002	DE 10064948 C1 AU 1900802 A WO 0249681 A1	11-07-2002 01-07-2002 27-06-2002
WO 0192475	A	06-12-2001	DE 10026480 A1 WO 0192475 A2	13-12-2001 06-12-2001
EP 0281736	A	14-09-1988	CH 671683 A5 AT 90545 T DE 3881720 D1 EP 0281736 A1 US 4908013 A	29-09-1989 15-07-1993 22-07-1993 14-09-1988 13-03-1990
WO 9116009	A	31-10-1991	AU 656725 B2 AU 7792591 A CA 2082176 A1 EP 0537167 A1 FI 925083 A IL 97896 A NO 924307 A NZ 237832 A WO 9116009 A1 ZA 9102882 A	16-02-1995 11-11-1991 18-10-1991 21-04-1993 09-11-1992 26-05-1995 18-11-1992 26-05-1994 31-10-1991 29-01-1992
WO 8903875	A	05-05-1989	US 4883755 A AU 610292 B2 AU 2610388 A CA 1325153 A1 DE 3891033 C2 DE 3891033 T0 DK 318189 A FI 893126 A JP 2502021 T KR 9705044 B1 NL 8820948 A NO 892660 A SE 501117 C2 SE 8902344 A WO 8903875 A1	28-11-1989 16-05-1991 23-05-1989 14-12-1993 16-04-1998 21-12-1989 28-08-1989 27-06-1989 05-07-1990 11-04-1997 01-09-1989 18-08-1989 21-11-1994 28-06-1989 05-05-1989
WO 0224242	A	28-03-2002	DE 10047300 A1 AU 1208602 A WO 0224242 A1	18-04-2002 02-04-2002 28-03-2002
WO 9524873	A	21-09-1995	AU 1931495 A EP 0871414 A1 JP 9510108 T WO 9524873 A1 US 5899936 A US 5613982 A US 5632778 A	03-10-1995 21-10-1998 14-10-1997 21-09-1995 04-05-1999 25-03-1997 27-05-1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/08781

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9524873	A	US 5843182 A	01-12-1998
WO 9215259	A	17-09-1992	US 5192312 A 09-03-1993
		AU 1577792 A	06-10-1992
		CA 2105478 A1	06-09-1992
		DE 69227103 D1	29-10-1998
		DE 69227103 T2	25-02-1999
		EP 0574527 A1	22-12-1993
		ES 2122994 T3	01-01-1999
		US 5772695 A	30-06-1998
		WO 9215259 A1	17-09-1992
		US 5863296 A	26-01-1999
		US 5855617 A	05-01-1999
WO 0149210	A	12-07-2001	US 6376244 B1 23-04-2002
		AU 2095001 A	16-07-2001
		EP 1244396 A1	02-10-2002
		WO 0149210 A1	12-07-2001
		US 2002102727 A1	01-08-2002
WO 9632905	A	24-10-1996	AU 5564996 A 07-11-1996
		EP 0821573 A1	04-02-1998
		WO 9632905 A1	24-10-1996
		US 5855620 A	05-01-1999
		ZA 9603151 A	24-04-1997

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 A01N1/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

 Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 A01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	P. LAMM, G. JUCHEM, P. WEYRICH, S. NEES & B. REICHART: "New alternative coronary bypass graft: first clinical experience with an autologous endothelialized cryopreserved allograft." J. THORAC. CARDIOVASC. SURG., Bd. 117, 1999, Seiten 1217-1219, XP009005643 in der Anmeldung erwähnt Seite 1217, Spalte 2, Zeile 5-24; Abbildung 1 --- -/--	1-76

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

17. Februar 2003

Absenddatum des Internationalen Recherchenberichts

05/03/2003

 Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Klaver, J

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	P. LAMM, G. JUCHEM, S. MILZ, M. SCHUFFENHAUER & B. REICHART: "Autologous endothelialized vein allograft." CIRCULATION, Bd. 104, Nr. Supp.I, 18. September 2001 (2001-09-18), Seiten I.108-I.114, XP002231247 das ganze Dokument	1-76
X	WO 99 00152 A (HAVERICH AXEL; BADER AUGUSTINUS (DE); STEINHOFF GUSTAV (DE)) 7. Januar 1999 (1999-01-07) Seite 1, Absatz 1 Seite 3, Zeile 9-29 Seite 6, Zeile 11-27 Seite 9, Zeile 28 -Seite 10, Zeile 15 Seite 12, Zeile 31 -Seite 13, Zeile 31	1-78
P,X	WO 02 49681 A (DOHMEN PASCAL; AUTO TISSUE GMBH (DE); KONERTZ WOLFGANG (DE)) 27. Juni 2002 (2002-06-27) Seite 2, Zeile 1-11 Seite 3, Zeile 1-30 Seite 5, Zeile 4 -Seite 6, Zeile 4; Abbildung 1	1-43,47
P,X	WO 01 92475 A (BADER AUGUSTINUS) 6. Dezember 2001 (2001-12-06) Seite 5, Zeile 7-26 Seite 8, Zeile 1-8 Seite 9, Zeile 14-20 Seite 11, Zeile 13 -Seite 12, Zeile 5	48-76
X	EP 0 281 736 A (SULZER AG) 14. September 1988 (1988-09-14) Spalte 5, Zeile 15 -Spalte 6, Zeile 32	1-29
X	WO 91 16009 A (CURATIVE TECH INC) 31. Oktober 1991 (1991-10-31) Seite 4, Zeile 17-31 Seite 5, Zeile 35 -Seite 6, Zeile 4 Seite 6, Zeile 23 Seite 7, Zeile 10-17 Seite 8, Zeile 6-21 Seite 41, Zeile 28 -Seite 42, Zeile 12	48-76
X	WO 89 03875 A (UNIV JEFFERSON) 5. Mai 1989 (1989-05-05) Seite 7, Zeile 16-22 Seite 8, Zeile 1-8 Seite 8, Zeile 35 -Seite 9, Zeile 2 Seite 10, Zeile 15-34	48-76

	-/--	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
P,X	WO 02 24242 A (FREIER THOMAS ;STEINHOFF GUSTAV (DE)) 28. März 2002 (2002-03-28) Seite 3, Zeile 34 -Seite 4, Zeile 23 Seite 6, Zeile 14-28 Seite 9, Zeile 5-25	44-46
Y	WO 95 24873 A (CRYOLIFE INC) 21. September 1995 (1995-09-21) in der Anmeldung erwähnt Seite 5, Zeile 4-24 Seite 9, Zeile 20-27 Seite 15, Zeile 27 -Seite 16, Zeile 26 Seite 19, Zeile 15-17 Seite 21, Zeile 4 -Seite 22, Zeile 28 Seite 23, Zeile 22-27	1-43
X	Seite 26, Zeile 3-6 Seite 29, Zeile 3-22	48-76
Y	WO 92 15259 A (UNIV COLORADO RES) 17. September 1992 (1992-09-17) in der Anmeldung erwähnt Seite 6, Zeile 18-27 Seite 8, Zeile 17-25	1-43
X	Seite 9, Zeile 11-13 Seite 9, Zeile 36 -Seite 10, Zeile 28	48-52
Y	WO 01 49210 A (CHILDRENS MEDICAL CENTER) 12. Juli 2001 (2001-07-12) Seite 3, Zeile 13 -Seite 4, Zeile 6 Seite 7, Zeile 1-14 Seite 10, Zeile 8-26 Seite 11, Zeile 17-24	1-43
X	Seite 12, Zeile 3-18; Beispiel 1	29
Y	WO 96 32905 A (BISHOPRIC NANETTE H; DOUSMAN LINDA (US); ST JUDE MEDICAL (US); YAO) 24. Oktober 1996 (1996-10-24) Seite 6, Zeile 13-20 Seite 7, Zeile 2-14 Seite 14, Zeile 30 -Seite 15, Zeile 13; Beispiele 1,4	1-43

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung zur selben Patentfamilie gehören

Internas Aktenzeichen

PCT/EP 02/08781

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9900152 A	07-01-1999	WO 9900152 A2 DE 19828726 A1 DE 59803925 D1 EP 0989867 A2 ES 2175753 T3 JP 2002507907 T	07-01-1999 07-01-1999 29-05-2002 05-04-2000 16-11-2002 12-03-2002
WO 0249681 A	27-06-2002	DE 10064948 C1 AU 1900802 A WO 0249681 A1	11-07-2002 01-07-2002 27-06-2002
WO 0192475 A	06-12-2001	DE 10026480 A1 WO 0192475 A2	13-12-2001 06-12-2001
EP 0281736 A	14-09-1988	CH 671683 A5 AT 90545 T DE 3881720 D1 EP 0281736 A1 US 4908013 A	29-09-1989 15-07-1993 22-07-1993 14-09-1988 13-03-1990
WO 9116009 A	31-10-1991	AU 656725 B2 AU 7792591 A CA 2082176 A1 EP 0537167 A1 FI 925083 A IL 97896 A NO 924307 A NZ 237832 A WO 9116009 A1 ZA 9102882 A	16-02-1995 11-11-1991 18-10-1991 21-04-1993 09-11-1992 26-05-1995 18-11-1992 26-05-1994 31-10-1991 29-01-1992
WO 8903875 A	05-05-1989	US 4883755 A AU 610292 B2 AU 2610388 A CA 1325153 A1 DE 3891033 C2 DE 3891033 T0 DK 318189 A FI 893126 A JP 2502021 T KR 9705044 B1 NL 8820948 A NO 892660 A SE 501117 C2 SE 8902344 A WO 8903875 A1	28-11-1989 16-05-1991 23-05-1989 14-12-1993 16-04-1998 21-12-1989 28-08-1989 27-06-1989 05-07-1990 11-04-1997 01-09-1989 18-08-1989 21-11-1994 28-06-1989 05-05-1989
WO 0224242 A	28-03-2002	DE 10047300 A1 AU 1208602 A WO 0224242 A1	18-04-2002 02-04-2002 28-03-2002
WO 9524873 A	21-09-1995	AU 1931495 A EP 0871414 A1 JP 9510108 T WO 9524873 A1 US 5899936 A US 5613982 A US 5632778 A	03-10-1995 21-10-1998 14-10-1997 21-09-1995 04-05-1999 25-03-1997 27-05-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung e zur selben Patentfamilie gehören

Internat 35 Aktenzeichen

PCT/EP 02/08781

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9524873 A		US 5843182 A	01-12-1998
WO 9215259 A	17-09-1992	US 5192312 A	09-03-1993
		AU 1577792 A	06-10-1992
		CA 2105478 A1	06-09-1992
		DE 69227103 D1	29-10-1998
		DE 69227103 T2	25-02-1999
		EP 0574527 A1	22-12-1993
		ES 2122994 T3	01-01-1999
		US 5772695 A	30-06-1998
		WO 9215259 A1	17-09-1992
		US 5863296 A	26-01-1999
		US 5855617 A	05-01-1999
WO 0149210 A	12-07-2001	US 6376244 B1	23-04-2002
		AU 2095001 A	16-07-2001
		EP 1244396 A1	02-10-2002
		WO 0149210 A1	12-07-2001
		US 2002102727 A1	01-08-2002
WO 9632905 A	24-10-1996	AU 5564996 A	07-11-1996
		EP 0821573 A1	04-02-1998
		WO 9632905 A1	24-10-1996
		US 5855620 A	05-01-1999
		ZA 9603151 A	24-04-1997